

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT D'HYGIÈNE ET DE BACTÉRIOLOGIE
DIRECTEUR: PROFESSEUR PAUL HAUDUROY

Les substances bactéricides du liquide buccal

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE DENTAIRE

PAR

RENÉ-PIERRE CAFLISCH

MÉDECIN-DENTISTE DIPLOMÉ DE LA CONFÉDÉRATION SUISSE

Lane Medical Library

1948

F. ROTH & C^{ie} S. A.

ÉDITEURS
LAUSANNE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Les
substances bactéricides
du liquide buccal

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT D'HYGIÈNE ET DE BACTÉRIOLOGIE
DIRECTEUR: PROFESSEUR PAUL HAUDUROY

Les substances bactéricides du liquide buccal

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE DENTAIRE

PAR

RENÉ-PIERRE CAFLISCH

MÉDECIN-DENTISTE DIPLOMÉ DE LA CONFÉDÉRATION SUISSE

1948

F. ROTH & C^{ie} S. A.

ÉDITEURS
LAUSANNE

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Le conseil de la Faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de MM. les professeurs

HAUDUROY et VANNOTTI

et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée :

Les substances bactéricides du liquide buccal

présentée par M. René-Pierre Cafilisch pour l'obtention du grade de Docteur en médecine dentaire.

Lausanne, le 27 octobre 1947.

Le Doyen :

Prof. P. DECKER.

A la mémoire de mon père.

A ma mère.

*Ce travail est respectueusement
dédié au*

*Professeur PAUL HAUDUROY
en hommage et en reconnaissance
pour sa bienveillante sollicitude
et ses précieux conseils.*

PRÉFACE

Il est extrêmement curieux de voir comment certaines parties de la science bactériologique ont été peu étudiées ou ne l'ont été que d'une façon fragmentaire. Ces *zones d'ombre* dans nos connaissances sont, de toute évidence, parmi les plus passionnantes à parcourir pour le chercheur. Il est presque certain, en effet, d'y rencontrer des phénomènes inconnus ou peu connus dont l'importance peut être considérable. Témoin en est le sujet qu'a traité le Dr Caflisch. La bouche humaine réunit les conditions les meilleures de température, d'humidité, pour favoriser au maximum la croissance des germes, qui y pénètrent en nombre considérable et avec la plus grande facilité. On devrait théoriquement se trouver en présence d'un milieu profondément infecté, dangereux par conséquent pour l'organisme, soit localement, soit à distance.

Or, phénomène étonnant, le milieu buccal d'un organisme en état normal, s'il est souillé — et il ne peut pas ne pas l'être — ne l'est jamais avec excès. Bien plus : des microbes introduits de l'extérieur ne peuvent s'y fixer, les plaies expérimentales ou accidentelles s'y guérissent avec une facilité extrême.

Paradoxe semble-t-il que tout cela.

Paradoxe apparent simplement dû, en réalité, à une connaissance insuffisante. Le problème a préoccupé depuis longtemps les chercheurs. Faisant des hypothèses, expérimentant, ceux-ci ont pu apporter au cours de ces vingt dernières années quelques éclaircissements. L'une des découvertes les plus curieuses des propriétés particulières du liquide buccal a été faite par Sir Alexandre Fleming. Il réussit en effet à isoler de la salive une substance, le lysozyme, qui a la propriété de lyser, de détruire complètement un grand nombre de germes. Son étude a été très poussée et quelques applications en ont été faites dans le traitement de certaines infections. Il s'en fallut d'ailleurs de peu que Sir Howard Florey, Chain, et l'équipe d'Oxford n'aborde systématiquement l'étude du lysozyme et ne s'intéresse pas à l'autre découverte de Sir Alexandre Fleming, la pénicilline.

Un peu plus tard, Dold et Weigmann, étudiant l'angine diphtérique, découvrirent que la salive possédait, dans certains cas, une action inhibitrice sur le bacille diphtérique. Ils découvrirent même qu'elle paraissait

capable de faire muter des bacilles diphtériques virulents en bacilles avirulents.

Je n'insisterai pas plus longtemps sur l'importance de ces découvertes. Elles sont pour la plupart à peine ébauchées et les chercheurs auront probablement beau jeu pour en extraire dans l'avenir toutes les conséquences qu'elles doivent comporter. Je suis certain d'ailleurs qu'à côté du phénomène de Fleming et de Dold, il existe encore de nombreuses inconnues qu'une recherche systématique mettrait en évidence.

Nous devons donc être reconnaissants au Dr Callisch d'avoir réuni tous les documents épars sur les « Substances bactéricides du liquide buccal », de les avoir groupés en un ensemble clair, facilitant ainsi la tâche de tous ceux qui voudront aborder expérimentalement ce sujet passionnant ou plus simplement qui voudront explorer avec un guide sûr des régions encore inconnues de la science.

Prof. PAUL HAUDUCROY.

Lausanne, le 22 octobre 1947.

INTRODUCTION

Le problème de l'action bactéricide du liquide buccal est un sujet vaste, très complexe, qui a eu des fortunes diverses, depuis le moment où l'on s'en est occupé jusqu'à nos jours.

Totalement nié par les uns, il a sans cesse trouvé de nouveaux défenseurs et, malgré l'enrichissement continu dont il a été l'objet, malgré les preuves de plus en plus nombreuses qui ont été établies, il ne semble pas que la discussion soit close.

Le but de ce travail est de présenter une vue d'ensemble sur ce problème et en particulier de nouveaux processus antibactériens découverts ces années passées : le phénomène de Fleming et les inhibines et mutines de Dold.

Un rappel des données physiologiques essentielles du liquide buccal en sera le point de départ. Un historique présentera ensuite l'essentiel des travaux et montrera les principales tendances qui dominèrent tour à tour. Enfin, l'étude du lysozyme de Fleming et du phénomène de Dold jettera une lumière nouvelle sur ce problème, aussi controversé actuellement qu'il l'était au début des recherches.

CHAPITRE PREMIER

LE LIQUIDE BUCCAL

La plupart des auteurs qui se sont occupés de notre sujet parlent de l'action bactéricide de la « salive ». Or, très souvent, ils estiment déterminante l'action de substances qui se trouvent avec ou dans la salive mais qui ont une provenance tout à fait différente. Ainsi nous verrons certains auteurs préconiser uniquement l'antagonisme bactérien, d'autres l'action des leucocytes et expliquer tout au long le passage de ceux-ci depuis la muqueuse dans le milieu buccal, d'autres encore envisager certaines propriétés spéciales de la muqueuse. Bref, une quantité d'éléments qui, si l'on veut être strict, ont bien un certain rapport avec la cavité buccale, mais, de par leur provenance et leur origine, ne sont pas identiques à la salive. En physiologie, ce terme désigne la sécrétion des diverses glandes parotides, sub-linguales et sous-maxillaires, etc.; gardons-lui donc son sens propre.

L'étude des travaux montrera que cet effet bactéricide est un phénomène si divers qu'il nous oblige à envisager une définition plus large, englobant tous les éléments susceptibles d'y jouer un rôle : *liquide buccal* ainsi que le nomme Dold ⁶¹⁶, nous paraît être le terme exact.

Il se compose de la salive proprement dite, des cellules épithéliales desquamées, des leucocytes, d'un nombre non encore déterminé de principes antibactériens relevant de l'immunité acquise, les anticorps, par exemple, ou de l'immunité naturelle comme le lysozyme ou les inhibines, enfin de la flore buccale.

Nous grouperons donc succinctement les notions essentielles se rapportant à cette conception, en laissant cependant volontairement dans l'ombre tout ce qui a trait à la digestion proprement dite et se trouve, par conséquent, en dehors de notre sujet.

LA SALIVE

Sa provenance. — Elle est formée, en premier lieu, par l'ensemble des sécrétions des glandes parotides (séreuses), sous-maxillaires (mixte: séro-muqueuses) et sub-linguales (muqueuses); il faut y ajouter celles des glandes séreuses ou muqueuses disséminées sur l'ensemble de la surface de la muqueuse de la cavité buccale. Celles-ci ne jouent qu'un rôle secondaire. A cette constitution histologique complexe correspond une innervation fortement différenciée.

Mécanisme de sécrétion. — Il est réflexe: par l'intermédiaire des nerfs sensitifs du goût: trijumeau, glossopharyngien et fibres gustatives de la chorde du tympan (VII), lingual, ainsi que du nerf optique (moelle du métencéphale) comme voies afférentes, il y a excitation des noyaux salivaires du bulbe (les noyaux tangorécepteurs de la muqueuse buccale y sont également associés, de plus il y a relation constante avec l'écorce).

Les voies efférentes sont les fibres sympathiques et parasympathiques qui vont innerver les glandes salivaires. Il y a lieu de remarquer ici une exception à la loi de l'antagonisme parasympathique-sympathique: les deux systèmes agissent dans le sens d'une excitation, mais l'influx sympathique donne une salive riche en mucine et peu abondante. Alors que l'influx parasympathique produit une salive pauvre en mucine et abondante.

Il existerait aussi des différences au point de vue teneur en composants organiques et inorganiques.

La concentration en K et Ca, les quantités d'albumine et mucines sont supérieures dans la salive sympathique. Cl et Na dominent dans la salive parasympathique (Kerztyüs et Martin J. ¹⁴³).

Mécanisme de régulation. — Elle est constante, sa production en 24 heures est de un demi à un litre, elle ne dépend pas de la volonté. Sa qualité et sa quantité sont entièrement modulées par les caractéristiques de l'excitation.

En principe, on en distingue deux variétés:

- a) La salive de défense ou de lavage.
- b) La salive de digestion.

La première est provoquée par des excitations mécaniques: sable, ouate, etc., ou par des excitations chimiques: acide, base. Elle est

fluide, pauvre en substances actives ; son but est d'éliminer mécaniquement les agents excitants.

La seconde est toujours épaisse, sa composition s'adapte pour une grande part aux substances nutritives présentes : à un élément acide répondra une salive alcaline, à une nourriture sèche, une salive fluide.

D'autre part, l'état de faim, une odeur appétissante, la vue d'un mets succulent, la seule influence de la pensée suffisent à provoquer des variations de la sécrétion : c'est la salive psychique.

On a ainsi à la fois des réflexes non conditionnels ou innés et des réflexes conditionnels ou psychiques. C'est dire qu'avec un mécanisme aussi complexe, la composition du liquide buccal sera variable à tout instant, jamais on ne pourra parler de composition normale ou moyenne. Toutes les recherches s'en ressentiront.

QUALITÉS PHYSIOLOGIQUES

La qualité la plus frappante est sa viscosité ; elle varie considérablement et dépend de la composition de la nourriture, ainsi que de la qualité de l'excitation* (*cf. supra*).

A part la viscosité, citons encore son trouble. Il apparaît un certain temps après le dernier repas, il est le fait des cellules.

L'examen microscopique révèle :

- a) Des corpuscules bactériens.
- b) Des cellules épithéliales.
- c) Des globules blancs.

La teneur en albumines dépend donc de ces composés. Les globules blancs sont pour les quatre cinquièmes des leucocytes à noyaux polymorphes ; on les appelle corpuscules salivaires (*Speichelkörperchen*).

D'après Hammerschlag et Laquer^{121, 122}, on en trouve 2000 à 4000/1mm³. Ils augmentent au cours de la journée (le matin : environ 400).

Les leucocytes pénètrent dans la cavité buccale et se nécrosent rapidement. Pour Hammerschlag¹²¹, leur provenance est incertaine ; Laquer¹²² l'attribue à la paroi postérieure du pharynx (*hinteres Rachendach*). D'après lui, il en passerait une quantité telle qu'elle

* D'après EGGERS-LURA : également d'une enzyme : la mucinase.

suffirait entièrement à justifier les chiffres trouvés dans la salive. Ils proviendraient des glandes, les cellules épithéliales d'ailleurs également ; elles seraient entraînées par l'expulsion des sécrétions hors des alvéoles séreuses et des canaux excréteurs muqueux.

A côté des produits du métabolisme basal, les oxydases exercent un chimiotactisme positif (F. N. Schulz ²⁷²). Il s'y ajoute chez de nombreux sujets les cellules et substances rejetées par les processus inflammatoires marginaux de la gencive.

Le taux véritable en produits organiques dépend donc du taux en cellules, mais il s'y ajoute les albumines libres (albumines et globulines) qui ne sont pas sécrétées régulièrement par les glandes. Dans la salive fluide de la parotide se trouvent des quantités appréciables d'une albumine dont la nature est encore inconnue et qui semble être une substance du genre des globulines.

Un dernier point intéressant est la valeur de l'abaissement cryoscopique : $\Delta = -0,2$ à $-0,4^{\circ}\text{C}$. Pour le sérum, il est de : $\Delta = -0,56$. Ceci présente un certain intérêt, car on peut admettre que la formation de la salive s'effectue à partir du sang. On s'est souvent demandé s'il s'agit d'une simple filtration. Or, ceci est impossible, il y a bien sécrétion cellulaire. Elle s'effectue en effet également bien avec une pression sécrétoire $= 0$ ou plus élevée que celle du sérum, et d'autre part, les valeurs respectives des composants chimiques sont trop différentes dans l'une et l'autre humeur. Enfin, on constate la présence dans la salive de substances qui n'existent pas dans le sérum : ptyaline, mucine, les enzymes*. Les glandes salivaires sont donc bien capables de faire la synthèse de produits propres et de sécréter par elles-mêmes la salive.

SA COMPOSITION

C'est un liquide ordinairement légèrement opalescent, incolore et inodore, filant.

Son poids spécifique est de 1,0020 - 1,0060.

Sa teneur totale en substances sèches est d'environ 0,5 - 0,6 %.

Celle des sels représente 0,2 - 0,3 %.

Celle des corps organiques : 0,3 - 0,4 %, soit environ 60 %.

* Cf. EGGERS-LURA : Note additionnelle p. 124.

Tableau comparatif représentant les composants inorganiques de la salive et du sérum, d'après Hammerbacher et Rein (244b).

	Dans 100 p. de cendres	Dans 100 p. de sérum
	<i>Salive</i>	<i>Sérum</i>
Cl	14,21	0,320 - 0,4
K	37,40	0,016 - 0,024
Na	7,00	0,335 - 0,410
Ca	3,57	0,008 - 0,012
Mg	0,09	0,001 - 0,004
H ₃ PO ₄	14,34	0,003 - 0,01
H ₂ SO ₄	3,07	

On remarquera que le % de K est plus élevé que celui du Na (c'est l'inverse du sérum) ainsi que le taux considérable du Ca, si important dans la formation du tartre dentaire.

Les composés organiques sont :

1. Albumine en petite quantité.
2. Mucine, une glycoprotéide.
3. Ptyaline, le composant le plus important, maltases et oxydases.
4. Les sels de CNS, substances dont l'action est peu connue et méconnue, plus abondantes chez la femme que chez l'homme, chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. C'est un élément constant de la salive : sa concentration est de 0,10 - 0,20 % (Larget et Schiff ¹³³). Celle-ci varierait avec la concentration de la salive ; elle proviendrait des glandes parotides et sous-maxillaires, et n'aurait aucun rapport avec l'état des dents.

Le pH varie entre l'acidité et l'alcalinité, la détermination exacte de la concentration ionique ne donne pas de loi fixe. Pour Strebinger (²⁷⁸), elle serait de pH = 3,63 - 7,86, ce qui paraît exagéré.

Pour Knorr ¹⁵⁴, il se trouverait à pH = 8 après le petit déjeuner, à jeun entre pH = 6,5 et 7,4, ce qui semble plus sûr.

PROPRIÉTÉS SÉROLOGIQUES DU LIQUIDE BUCCAL

Alors que l'étude des qualités sérologiques du liquide buccal chez les animaux à sang froid a été très poussée depuis longtemps, il n'y a que très peu de travaux concernant les animaux à sang chaud, l'homme en particulier.

Les serpents spécialement ont fait l'objet d'études serrées ; leurs toxines se comportent comme de véritables antigènes et sont neutralisables par les antitoxines. Celles-ci se trouvent non seulement dans le liquide buccal, mais également, bien qu'en plus faible quantité, dans le sang, le sérum.

Les premiers travaux systématiques pour le liquide buccal humain ont été entrepris par Seitz en 1913, Rosenow et Amoss ^{274, 258}.

A. *Expériences de sensibilisation :*

Pour eux, on peut sensibiliser des cobayes avec du liquide buccal contre l'effet de la réinjection de sérum homologue et hétérologue. D'après Seitz, cette injection s'est révélée souvent toxique pour l'animal. D'autre part, il obtient dans certaines conditions des effets anaphylactiques, bien que cela ne lui paraisse pas des plus nets : les résultats sont encore trop contradictoires.

Les recherches inaugurées par Landsteiner en 1901 pour le sérum ont été également effectuées pour les autres humeurs. En ce qui concerne les animaux à sang chaud, les premières recherches sont dues à v. Halpern, v. Dungern et Hirschfeld (1910 - 1911 ^{120, 76}).

B. *Facteurs spécifiques de groupe :*

C'est en 1926 que la présence dans le liquide buccal humain de substances spécifiques de groupe a été mise en évidence, pour la première fois, par Sirai ; K. Yamakami, la même année, démontra la présence de celle du groupe A ^{276, 209}.

Cette découverte est confirmée d'abord par Lehrs ¹⁶⁹ en 1930 ; opérant sur 40 personnes, il fait la preuve par l'inhibition de l'isoagglutination et de l'isolyse des agglutinines spécifiques de groupe correspondant aux échantillons du groupe A et B. Pour lui, les substances spécifiques A et B sont contenues dans la salive sous forme d'antigènes.

Des recherches systématiques étendues furent effectuées la même année par Tanno Putkonen ²⁴². Il trouva dans 86 % des cas étudiés les substances spécifiques de groupe. D'après lui, la présence ou l'absence de ces substances est certainement due à des causes constitutionnelles.

En 1932, Schiff et Sasaki ²⁶⁹ mettent en évidence la présence de facteurs de groupe A, B et O, détruits tous trois par le ferment de groupe sanguin (pas de facteurs M et N). Ils constatent l'existence

de Ausscheider et Nichtausscheider, ce qui serait dû à la présence ou à l'absence d'un facteur mendélien S (Ausscheider = type sécrétant régulièrement la substance spécifique de groupe) dominant et d'un facteur s (Nichtausscheider = type ne sécrétant pas la substance spécifique de groupe).

Pour chaque facteur de groupe A, B, O ou AB, l'un des deux est toujours présent, bien que l'attribution de l'un ou de l'autre caractère s'effectue d'une manière absolument indépendante pour chacun des facteurs de groupe. Ce fait doit être considéré comme un exemple de la variabilité de la répartition d'un caractère héréditaire.

Examinant la possibilité de distinguer sérologiquement la salive du sérum par l'épreuve de complément, Henle et Witebsky³⁰⁵, en 1933, ont obtenu, après traitement préalable d'un lapin avec de la salive inactivée et centrifugée, des antisera qui réagissent principalement avec leur antigène spécifique : la salive, par contre, peu ou pas du tout avec le sérum humain. Ils indiquent un comportement analogue pour les antisera de sera humains qui ne réagissent le plus souvent que très faiblement avec la salive. D'après leurs recherches, il faut distinguer deux principes nettement définis : *les substances spécifiques de groupe et la substance spécifique de la salive*. Celle-ci est relativement thermo et coctostable à 100°, nette différence donc d'avec celle du sérum qui perd sa spécificité après 30 minutes de cuisson à l'eau bouillante. De plus, par l'intervention des ferments de groupe, l'une et l'autre sont détruites.

Pour Henle¹²⁸, la présence ou l'absence de la substance spécifique de groupe dans la salive est indépendante de la teneur du sang en ferments spécifiques de groupe.

Chez les types sécréteurs comme chez les types non sécréteurs, on retrouve toujours la substance spécifique de la salive ainsi que celle de l'espèce. Il n'y a aucun rapport ni parallélisme entre la production de substance spécifique de la salive et celle de substances spécifiques de groupe. Les types sécréteurs de groupe réagiraient plus fortement envers l'antisérum du sérum qu'envers celui de la salive.

Rex-kiss (1943)²⁵⁰ s'est occupé spécialement du groupe O. Il a pu prouver, en traitant des lapins avec du liquide buccal humain (groupe O), la formation d'anticorps liant le complément, précipitant les immunsera de la salive et réagissant uniquement avec l'antigène spécifique : la salive, à l'inverse des sérums immunsera du sang qui précipitent aussi la salive. Chez le chien et le chat, il existe une spécificité organique étroite, les sérums immunsera du sang ne précipitent pas la salive.

Etudiant le groupe A ²⁴⁹, il recherche les différenciations possibles d'avec celles des globules rouges et de l'urine. Deux méthodes sont possibles :

a) Par détermination de la nature chimique.

b) Par des méthodes purement sérologiques.

Au point de vue de leur nature chimique, Schiff, Kin et Landsteiner ^{264 142 163} estiment que celles de la salive ont des qualités se rapprochant des polysaccharides.

Kossjakow ¹⁵⁸ isole des substances du genre polysaccharides à partir des globules rouges, Schiff et Freudenberg ^{264, 98} en retrouvent également dans l'urine.

D'autre part, utilisant des méthodes sérologiques, Friedenreich, Thyssen et Hartmann ¹⁰³ trouvent plusieurs différenciations sérologiques entre les globules rouges et la salive ; par exemple, la substance spécifique de groupe contenue dans les globules rouges lie les anticorps du sérum isoanti A et de l'immunsérum anti A ; dans la salive, par contre, seul le sérum iso-anti A est lié.

Expérimentalement, on constate que les substances spécifiques de groupe de la salive (bœuf) se comportent comme celles des globules rouges ; d'autre part, l'agglutination donne également une liaison, mais différente de celle de la salive humaine (preuve par l'inhibition). Ils concluent à une différenciation sérologique nette entre substance spécifique de groupe A des globules rouges et celle de la salive.

Dahr et Lindau ⁵³ étudiant la substance spécifique B constatent que les agglutinogènes B dans la salive et dans le sang n'ont pas la même structure. Si l'on admet avec Friedenreich et With ¹⁰¹ que l'agglutinogène B se compose de 3 particules, B₁, B₂, B₃, auxquelles correspondent respectivement 3 particules B₁, B₂, B₃ de l'agglutinine anti B ; pour Dahr et Lindau on ne retrouve que B₃ dans la salive, alors que l'on a B₂ et B₃ pour les globules rouges (chez le lapin).

Kauerz ¹⁴² observe des différenciations semblables entre types sécréteurs et types non-sécréteurs. On a donc des différenciations qualitatives nettes.

Reprenant ces faits, Rex-kiss ²⁴⁹ montre que la particule d'hydrate de carbone obtenue par la méthode de Kossjakow n'a un effet que de 1/20 - 1/40 de celle de la solution isotonique de sang à l'épreuve d'agglutination et à celle de l'hémolyse. D'autre part, utilisant une dose de sérum telle qu'elle maintienne l'expérience à la limite de la

visibilité, il fait le test de l'effet inhibiteur de l'épreuve de l'agglutination de la salive A envers les sérums :

1. Immun anti A (lapin).
2. Iso-anti A (homme).
3. Hétéro anti A (lapin).

Il ne réussit pas à prouver de différenciations sérologiques ni à l'épreuve de l'hémolyse ni à celle de l'agglutination. En augmentant la dose de sérum, il obtient bien des différenciations qu'il attribue cependant uniquement à la réversibilité de la liaison des anticorps dans l'inhibition, soit de l'agglutination, soit de l'hémolyse.

Quant à l'origine de ces substances, Godin ¹⁰⁸ a cru la voir dans la mucine ; étudiant la salive du bœuf, il pense qu'elle serait capable d'élaborer des anticorps, de réagir organospécifiquement à la réaction de précipitation. Mais c'est uniquement le fait de composants albumineux non extrayables ; il paraît douteux que la substance pure puisse créer des anticorps.

Pour Friedenreich ¹⁰², les facteurs seraient élaborés par la glande salivaire elle-même : il y aurait sécrétion et néoformation. Kauerz, à la suite des expériences de Dahr et Lindau, confirme que la substance spécifique B retrouvée dans les sécrétions de ces glandes est qualitativement différente de celle des globules rouges : c'est un argument en faveur de l'opinion de Friedenreich. Il ne semble donc pas qu'il y ait simple excrétion de substances circulant dans le sang de manière à y maintenir une concentration déterminée, comme le voulait Schiff.

Tosiro (1938) ²⁸⁵ constate la présence dans les glandes salivaires d'une substance spécifique de groupe ayant une action inhibante à l'épreuve de l'isohémoagglutination chez les individus des groupes A, B et AB. Chez les individus de groupe O, elle ferait défaut. Parmi les glandes, c'est la sub-linguale qui en contiendrait le plus, en deuxième rang viendrait la sous-maxillaire ; dans la parotide, on en retrouve que des traces. Il semble donc que la substance spécifique de groupe est principalement sécrétée par la glande sub-linguale et la sous-maxillaire. On ne pourra donc considérer comme types sécréteurs que les individus chez lesquels les glandes sub-linguales et sous-maxillaires contiennent ces substances spécifiques en grande quantité. Or, il semble qu'il s'agit uniquement d'une production des cellules muqueuses ; on peut donc considérer que cette substance est une mucine. Rex-kiss confirme ces données ; un prélèvement dans la salive démontre l'absence simultanée de mucine et de

substance spécifique du groupe A, on les retrouve dans l'albumine sécrétée par les glandes sous-maxillaires et sub-linguales.

On a recherché à élucider également de quelle façon les antigènes de groupe disparaissent dans la salive. Pour Hartmann (1941) ¹²⁴, la disparition spontanée de celles-ci au niveau de la salive serait due à des enzymes. Celles-ci proviendraient soit des bactéries, soit des glandes salivaires. L'observation attentive montre que tout se passe comme si les enzymes produites par les bactéries étaient seules en cause, celles-ci ont en effet la faculté de détruire les substances spécifiques de groupe des globules rouges et de se multiplier en bouche. On pourrait également songer à la participation d'une enzyme provenant de l'organisme ; or, l'expérience a montré que la quantité qui parvient à la salive est si faible qu'elle ne saurait influencer le processus de destruction. On ne peut donc lui attribuer un rôle indépendant des processus enzymatiques de provenance bactérienne. Bien plus, l'adjonction de bactéries semble masquer complètement le processus dû aux enzymes organiques.

Celles-ci ont été isolées dans la glande sous-maxillaire et le muscle quadriceps qui est normalement extrêmement pauvre en antigène. Par conséquent, il doit s'agir d'une enzyme sans action spécifique, mais à action générale sur les polysaccharides. Rares dans le corps humain, mais fréquentes chez les anaérobies, elles sont hautement destructives des substances spécifiques de groupe.

C. *Les anticorps :*

Il reste à voir ce qu'il en est des études faites concernant les anticorps. Plusieurs auteurs avaient déjà signalé leur présence dans le liquide buccal, ainsi Hulin, Grassnow, Bunting. Peregallo ²²⁵, dès 1936, montre que chez des lapins injectés avec des globules rouges de poule, la salive renfermerait de l'hémolysine antipoule, bien qu'à un titre plus faible que dans le sérum. Chez les lapins traités par 3 injections de sérum de cheval, les précipitines apparaissent simultanément dans la salive et le sang. Enfin, la salive des animaux immunisés avec des vaccins typhiques possède un titre assez élevé d'agglutinine antityphique.

Schubert ²⁷⁰, en 1939, a pu faire la preuve de la présence dans la salive de l'homme de substances qui ont les qualités d'antitoxines diphtériques. La présence de ces substances est en rapport direct avec l'état d'immunisation (et la réaction de Schick) de l'individu en

question. L'auteur inocula un homme avec de l'antitoxine et étudia la courbe d'immunisation dans le sérum et dans la salive. Les deux courbes se développent indépendamment l'une de l'autre. Pour la salive, on constate une forte augmentation, puis une baisse lente. Jusqu'ici, il n'a pu rapporter de résultat définitif (une année) que pour le lapin ; l'antitoxine se rencontre pendant toute la période d'immunisation, mais la sécrétion prolongée de quantités appréciables n'a pu être constatée. Un phénomène important à noter est l'autonomie de la production de cette substance dans la salive : ceci semble prouvé pour l'auteur, car la courbe d'immunisation est bien indépendante de celle du sérum, les valeurs augmentent plus vite ou plus fortement et baissent différemment. En fait, les quantités constatées sont faibles ; malgré cela l'effet paraît extrêmement bien marqué et de très grandes quantités de bacilles diphtériques sont impressionnées. Elle semble donc jouer un rôle bien réel ; celui-ci consisterait dans la neutralisation de la toxine diphtérique par l'antitoxine. Les bacilles diphtériques seraient ainsi sans défense contre l'action des cellules de l'organisme.

Cet exposé ne vise pas à être complet, son but est de montrer simplement l'état actuel des recherches. Les faits présentés sont cependant suffisamment nets : si l'on constate dans le sérum comme dans le liquide buccal la présence d'anticorps, leur comportement antibactérien diffère pour chacun d'eux. Il est adapté aux conditions spéciales du milieu. Il en va de même pour les substances spécifiques de groupe, leur provenance, les variétés présentes, leur structure propre différent chez un même individu.

Le liquide buccal possède donc une individualité sérologique propre bien définie.

LA FLORE BUCCALE

(cf. 160, 85, 235)

Généralités. — Le milieu buccal présente des conditions optimales pour le développement de la flore buccale. Tout d'abord, la température qui y règne, 37°, est des plus favorables. Elle peut être considérée comme constante sous la langue, variable dans les vestibules. L'air s'y renouvelle constamment, les aérobies y sont favorisés, les anaérobies végètent cependant dans les replis de la muqueuse où le

taux d'oxygène est suffisamment abaissé. Elle y est à l'abri de la lumière et des agents chimiques concentrés. Le pH variable en bouche, suivant les régions pourra être légèrement alcalin à la surface d'une langue humide, plutôt acide dans les brèches dentaires ou les replis muqueux, favorables toujours au développement des microorganismes. Quoique la salive elle-même soit un mauvais milieu nutritif, la nourriture leur est assurée par les cellules épithéliales desquamées, les leucocytes détruits, les débris alimentaires qui vont se loger dans les replis de la muqueuse gingivale, les espaces interdentaires et les dents cariées. Notons que les produits d'excrétion (Reiz-sérum de Kuster¹⁶⁰), expulsés par l'inflammation latente à peu près continue de la muqueuse gingivale, conviennent particulièrement bien aux spirilles et spirochètes. On les rencontre en effet en culture pure, tout le long du liseré gingival alors qu'il est extrêmement difficile d'en obtenir sur milieu artificiel.

Apparition et développement de cette flore. — La première description de la flore buccale est due à Loewenhoeck en 1722. On s'est efforcé également de connaître les conditions dans lesquelles la flore buccale vient s'établir. Elles ont été établies par les travaux de Lounkevitch et Brailowsky³⁹.

A la naissance, la bouche est stérile; ce n'est qu'à la sixième heure que les premiers microorganismes y pénètrent; on peut déterminer leur présence par l'examen direct dès la dixième heure. On a, en premier lieu, des germes aériens : sarcines et cocci qui proviennent du milieu ambiant. Puis avec le début de l'alimentation, par la mère, s'installent le streptocoque salivaire et le staphylocoque blanc. L'influence du milieu ambiant continue à jouer son rôle; si l'enfant demeure en clinique, par exemple, on pourra observer des germes pathogènes atténués tels que pneumocoque et streptocoque pyogène, ce qui n'est pas le cas à domicile.

Dès le douzième jour, le streptocoque salivaire prend de plus en plus d'importance; il devient la seule espèce constante jusqu'à 14 ans; les germes aériens, par contre, régressent et ont tendance à disparaître. La variété bactérienne s'accroît avec l'apport de la nourriture normale, la flore sera des plus variables; à part le streptocoque salivaire, il n'y aura aucune espèce constante. Tous ces microorganismes sont strictement aérobies, ce n'est que l'apparition des dents qui crée les conditions nécessaires à la vie des anaérobies (rétention alimentaire dans les espaces interdentaires avec taux d'oxygène abaissé).

Ce n'est cependant qu'à l'âge adulte qu'on constate véritablement une flore autochtone constante. Celle-ci est nettement différenciée localement ; ainsi les joues et la muqueuse du palais présentent : des cellules desquamées, des cocci grands et petits, le plus souvent ovalaires, toujours groupés par 2 (diplocoques), parfois et plus rarement quelques bâtonnets, des leptotrix et de rares spirilles.

L'examen de la langue montre les mêmes diplocoques, de rares cocci, des bâtonnets très courts ou longs, des spirochètes en quantités variables, peu de vibrions et des leptotrix.

Les gencives révèlent quelques cocci et suivant l'individu une prédominance, soit des bâtonnets à bout effilé G- surtout, soit des leptotrix ou encore des spirochètes.

On voit donc que les joues, le palais et les amygdales sont surtout porteurs de diplocoques ; sur la langue règnent des anaérobies facultatifs ou stricts ; l'extrémité comprend principalement des spirochètes et des leptotrix ; c'est le dos qui est le plus peuplé. Sur les gencives vivent les anaérobies stricts.

Un fait remarquable : c'est le caractère nettement individualisé de la flore autochtone buccale ; elle est bien constante pour un même individu, mais varie d'un sujet à l'autre. L'usage d'antiseptiques, les lavages de bouche, etc., n'exercent aucune influence sur la composition de la flore buccale. Par contre, une bouche bien entretenue présentera une flore aérobie ou anaérobie facultative, alors que celles qui manquent d'hygiène ont une prédominance anaérobie stricte. La présence de grands anaérobies protéolytiques est l'indice d'un état nettement pathologique de la bouche.

La flore autochtone de l'adulte. — On distingue principalement :

- I. Protozoaires animaux.
- II. Les spirochètes (groupe intermédiaire).
- III. Les protistes végétaux.

Groupe I :

Ont été décrits :

A) *Entamoeba buccalis* (Sternberg et Prowazek).

B) *Entamoeba buccalis maxima* (Kartulis, Doflein, Flexner).

Pour certains auteurs, on aurait encore une *entamoeba gingivalis* ainsi qu'une *entamoeba crassi dentalis*. Cependant, Smith, Allen et Bartels estiment que toutes ces formes sont identiques.

C) Protozoaires Ellermann.

D) Protozoaires Baumgartner.

E) Les flagellés :

1. Quelques-uns de la grandeur des cocci.

2. *Trichomonas buccalis hominis* (espèce la plus connue).

Les études faites sur la fréquence des amibes donnent un pourcentage assez variable, 62 % par exemple, d'après Williams, Rosenberg, Tam, Mendel, 40 % pour Mitschelle, Culpepper et Ayer, dans les cas normaux ; des pourcentages jusqu'à 95 % dans les cas de gingivites paradentosiques (Evans et Williams 1915 - Fischer 1927) on fait supposer qu'elles interviennent dans la pathogénie de cette affection ; en réalité, il semble plutôt qu'elles apparaissent secondairement dans les bouches mal tenues.

D'après Goadby et Willings, elles pourraient même remplir un rôle utile dans le nettoyage de la cavité buccale ; elles n'apparaîtraient qu'à un pH déterminé et grâce à la présence de débris alimentaires.

Pour d'autres, leur nombre varierait suivant l'état de santé de l'individu. On n'est donc pas très au clair sur leur activité véritable, en tout cas elles paraissent inoffensives.

Groupe 2 : Les spirochètes.

Ils ont été découverts dans la flore buccale par Loewenhoek. Ils forment un des chapitres les plus contradictoires de la bactériologie : on ne s'entend nullement sur leurs caractères cultureux d'où une classification purement morphologique (Hoffmann).

On distingue :

Spirocheta buccalis (colon) :

a) *Crassa*.

b) *Tenuis*.

c) *Inaequalis*.

Spirocheta media oris (Hoffmann-Prowarzek).

Quelques fines formes spirochètiennes :

a) *Dentium orthodonta* (Koch).

b) *Scoliodonta* (Hoffmann).

c) *Trimedonta* (Hoffmann).

Groupe 3 : Protistes végétaux.

Ils présentent une variété énorme de formes et d'espèces ; on trouve des cocci, des bâtonnets, des vibrions et des spirilles, avec toutes les formes de passage les plus diverses. Alors que la différenciation des espèces autochtones d'avec celles de passage est facile chez les

protozoaires animaux, chez les protistes végétaux, elle est d'autant plus ardue que le nombre des espèces est immense et les caractères morphologiques presque semblables. D'autre part, les maladies d'origine microbienne sont si peu connues dans la cavité buccale qu'il est impossible de distinguer un germe pathogène d'un symbiote inoffensif. Enfin, on peut affirmer que presque toutes les espèces connues de microorganismes, pathogènes ou saprophytes, ont été retrouvées dans la cavité buccale. On ne pourra donc reconnaître comme espèce autochtone que celle pour laquelle les auteurs ont décrit les propriétés biologiques et prouvé la présence constante dans la cavité buccale.

D'après Miller ²¹⁰ ²¹¹, il était classique de distinguer :

- a) Les espèces propres de la bouche.
- b) Les espèces apathogènes, les chromogènes et les cultivables.

Cette classification ne peut plus être acceptée actuellement ; cependant il n'a pas été possible jusqu'ici de lui en substituer une autre. On devra donc utiliser la classification systématique bactériologique habituelle : on distingue :

1. Leptotrix :

- a) *Innominata* (Miller). }
- b) *Racemosa* (Williams et Goodby). } N'ont pas été obtenues
- c) *Placoides alba buccalis* (Dobrzynieki). } en culture.
- d) *Buccalis* (Goodby, Robin, Vignal).

D'après Beust, une grande partie des cocci, bâtonnets et formes sporulées ovales, en demi-lune ou en faucille, qu'on retrouve dans les enduits dentaires, sont des formes de croissance de cette subdivision ; d'après Landau, ce serait également le cas pour le bacille diphtéroïde buccal.

2. Bactéries ou bacilles fusiformes :

- a) *Nucleatus* (Knorr).
- b) *Plaut-Vincent*.
- c) *Polymorphus* (Knorr).

Cette classification remplace tous les types décrits précédemment.

3. Vibrions :

- a) Trois espèces dont : *rugula* de Vignal.
- b) *Spirillum sputigenum* (Miller, Salomon, Ellermann).

4. Cocci :

- a) *Jodococcus magnus* (Miller).
- b) *Jodococcus parvus* (Miller).

- c) *Microoccus rosaceus* (Miller).
 - d) *Streptococcus longus* (Lingelsheim).
 - e) *Streptococcus brevis* (Lingelsheim).
 - f) Diplocoques :
 - 1. *Streptococcus acidilactis*.
 - 2. *Pneumococcus*.
- Staphylococcus salivarius* (Michel).

5. Bactéries chromogènes.

Leur étude est très contradictoire et peu poussée, leur signification pathogène discutée. Notons les cocci verts : on leur attribue une influence très grande sur les qualités antigéniques (Yamaguti), une élévation importante de la pathogénité par l'action simultanée de la salive. Pour Hegemann, ils seraient responsables de l'action bactéricide du liquide buccal.

D'après Besançon et Galli-Valerio, tous les streptocoques buccaux seraient des variétés du seul streptococcus pyogenes. D'après Seitz, les streptocoques buccaux correspondraient aux streptococcus lacticus (Kruse); le pyogène, les diplocoques et les pneumocoques s'y rapporteraient également.

Cf. aussi : PERRET (R. A.) Données actuelles sur la flore microbienne buccale à l'état normal et pathologique. — Thèse médecine (Paris) juillet 1947. — Va paraître chez R. Foulon. — Exposé très complet de la question (250 pages dactylographiées).

CHAPITRE II

LE PROBLÈME DE L'ACTION BACTÉRICIDE DU LIQUIDE BUCCAL

Le chapitre précédent a présenté brièvement les qualités essentielles du milieu buccal. Or, ce qui frappe d'emblée, c'est que cet ensemble réunit toutes les conditions les meilleures pour favoriser une prolifération et une croissance extraordinaires des microorganismes. En somme, tout devrait se passer comme si l'on était en présence d'un milieu de culture placé à l'étuve. On devrait, par conséquent, avoir un milieu d'une septicité extrême, des plus dangereux pour l'organisme localement ou à distance.

Or, que se passe-t-il ? Non seulement il n'y a pas de prolifération excessive des microorganismes, mais encore des microbes étrangers amenés fortuitement de l'extérieur n'y peuvent pas prendre pied ; il semble même s'établir une sorte d'équilibre. De plus, il est bien connu que toutes les plaies buccales, expérimentales ou par accident, se guérissent avec une facilité déconcertante. Avec un minimum de soins, les lésions les plus profondes, qu'on pense simplement aux traumatismes d'extraction, se réparent parfaitement. Tout cela n'est vrai naturellement qu'en conditions normales ; s'il y a un fléchissement de l'organisme en général, une affection à retentissement sur la cavité buccale, troublant l'équilibre normal du milieu buccal, la flore buccale se révélera alors dangereuse pour son porteur ; des espèces normalement saprophytes ou à pathogénité atténuée pénétreront en profondeur et pourront y créer des désordres.

Quoi qu'il en soit de cette croissance limitée et de cet équilibre de la flore buccale, cette facilité de guérison des plaies buccales a depuis longtemps frappé les observateurs : diverses explications ont été tentées ; l'exposé qui va suivre résumera ce qui a été proposé jusqu'ici.

PREMIÈRE PARTIE — RECHERCHES JUSQU'EN 1900

Les premières indications se trouvent chez Kletzinsky ¹⁵⁰ en 1852 ; il parle de *force antiseptique*, antifermentative dans la salive. Il y ramène l'inhibition des fermentations et du développement bactérien, non sans avoir exclu le ferment alcoolique. Comme il obtient de bons résultats avec le sulfocyanate de potassium, il formule l'hypothèse suivante : l'inhibition de ces processus nocifs, de ces lyses buccales, devrait être attribuée au taux en sels de CNS.

Cette première esquisse du problème fut reprise en 1891 par Sanarelli ²⁵⁹. Nous sommes dans les années des grandes découvertes de l'équipe pastorienne, les découvertes des principaux microbes paraissent successivement ; la flore bactérienne de la bouche a également excité l'attention des chercheurs ; Sanarelli en cite toute une série ; l'un ou l'autre émet une opinion sur la question qui nous intéresse.

Ainsi Valuda (1888) ²⁹⁰ estime qu'il serait possible que la salive ait un pouvoir chimique spécial exerçant une action sur le bacille de Koch ; il admet cependant qu'il puisse être détruit plus simplement par les microorganismes de la bouche.

Dietrich ⁵³ en 1890 décrit une sorte de combat pour la vie entre les microorganismes de la bouche et dont la conséquence serait l'écrasement et la neutralisation des bactéries pathogènes par les saprophytes.

Personnellement, Sanarelli estime que la salive humaine est un mauvais terrain pour certains microbes pathogènes. Elle posséderait même la faculté de les détruire, s'ils ne sont pas trop nombreux ; elle serait en tout cas *capable de modifier* le type normal de ceux qu'elle laisse se développer (pneumocoques), de les affaiblir ou de les rendre complètement inoffensifs.

Pour Miller (1890) ²¹⁰, il n'y a rien d'étonnant à ce que la salive filtrée, telle que l'a utilisée Sanarelli, soit un milieu de culture défavorable aux microbes puisqu'elle ne contient que 0,15 % de matières organiques, alors que la salive non filtrée en contient une assez grande quantité. Il ne croit cependant pas aux propriétés bactéricides de la salive et estime que l'immunité de la cavité buccale tient au pouvoir de résistance de la gencive.

Galippe (1894) ¹⁰⁴ retrouve de façon constante des microbes dans les canaux excréteurs des glandes salivaires, ce qui ne parle pas en faveur d'une action bactéricide.

Mills (1896)²¹³ estime que la salive, soit comme milieu physico-chimique (par action plasmolytique des sels), soit comme milieu chimique (action toxique des germes), arrête la poussée de la plupart des microbes et leur est germicide. En tant que milieu physiologique, elle a une action moindre, à cause de la présence des ferments et matières albuminoïdes qui entravent l'action des sels. Elle atténuerait la poussée de la plupart des microbes et préparerait l'action du suc gastrique. Enfin, les associations microbiennes salivaires augmenteraient la virulence des germes importés (la salive stérilisée n'aurait à ce point de vue aucune action exacerbante).

La même année, paraissait un travail d'ensemble qu'on peut considérer encore aujourd'hui comme fondamental, dû à Hugenschmidt (Paris)¹³³. Il pose véritablement le problème dans toute son ampleur et toutes les recherches subséquentes, à part celles de Fleming, Dold et de leurs collaborateurs, ne seront que reprises ou précisions apportées aux différents mécanismes définis et décrits à l'époque.

Pour Hugenschmidt, il n'y a aucune différence entre la salive filtrée à la bougie de Chamberland et la salive non filtrée : le pouvoir bactéricide reste le même. Le sang a également des propriétés bactéricides ou inhibitrices : les germes meurent sans s'y être développés : ces qualités disparaissent à 55°. En ce qui concerne la salive, il note une action peu marquée de la salive non chauffée, une action plus prononcée à 56°, ceci sur la torula ; sur la sarcine, par contre, il n'y a aucun effet.

Le développement du streptocoque ne paraît pas influencé ; sur le staphylocoque doré, par contre, il y a une action certaine, d'autant plus marquée que la salive est chauffée (aucune action sur le vibron cholérique).

L'action bactéricide lui paraît des plus problématiques ; il semble cependant y avoir au début de l'expérience une certaine lenteur de croissance, peut-être destruction (transplantation des germes). Rôle mécanique : il est considérable, c'est la sécrétion parotidienne qui a le plus d'effet ; elle dilue, agglutine et entraîne dans l'estomac les bactéries ; elles y sont tuées par l'action du suc gastrique.

Si la sécrétion diminue, la cavité buccale devient la porte d'entrée d'une foule de microorganismes pathogènes. On peut donc lui attribuer les rôles suivants :

1. Elle dilue, agglutine et entraîne les microorganismes.
2. Sa réaction cellulaire est nocive (Mendel Joseph-Frey et Sauvez).

Rôle du sulfocyanate : les expériences de l'auteur ont donné un résultat complètement négatif.

Rôle phagocytaire : on constate la présence d'innombrables leucocytes de toute nature derrière la membrane épithéliale ; il y a un véritable lac lymphatique, les leucocytes passeraient sur la muqueuse à partir de cette couche (Stoer) ; en fait, ils sont présents dans les sécrétions et visibles à l'examen microscopique.

Propriétés chimiotactiques (Bordet et Massart) : les bactéries fabriquent une substance capable d'exercer une réaction chimiotactique positive sur les leucocytes ; ceux-ci présentent une accoutumance progressive aux toxines, ce qui favoriserait donc la phagocytose.

On peut déduire des expériences faites que la salive exerce une influence chimiotactique positive, dans le cas d'une plaie buccale, dont les effets sont d'autant plus marqués que cette influence s'exerce d'une manière constante et prolongée.

Tous les microbes prélevés en bouche et soumis à l'action des leucocytes de cobayes sont phagocytés. Si l'on opère avec de la salive filtrée, on constate la disparition de cette attraction ; c'est donc la présence des microorganismes qui importe.

Rôle des cellules épithéliales et de la concurrence vitale : il y a une desquamation continuelle qui entraîne les microbes logés à leur surface. C'est donc un rôle purement mécanique. Pour Mendel Joseph, il y a de plus une concurrence vitale : les microbes se gênent mutuellement et certaines espèces plus vigoureuses étouffent les espèces délicates.

On se trouve donc en présence de phénomènes de *phagocytose* complétés par l'attraction spéciale produite par les bactéries de la salive sur les leucocytes et le rôle mécanique de la desquamation cellulaire. Si les propriétés bactéricides de la salive ne sont pas démontrées, si l'on peut fortement douter de son rôle dans l'atténuation de la virulence des microorganismes pathogènes qui sont les commensaux habituels de la cavité bucco-pharyngée, il n'en va pas de même des *propriétés chimiotactiques positives*. Celles-ci s'exerçant par l'intermédiaire de produits mis en solution par les microbes, expliquent les diapédèses si importantes qui se passent au niveau de la muqueuse buccale, intenses particulièrement à la surface des plaies baignées par la salive.

Citons encore en 1898 les recherches de Triolo ²⁸⁶ ; celui-ci utilise une technique un peu différente ; il procède, en effet, à une

désinfection étendue de la cavité buccale, de façon à prélever de la salive absolument fraîche et nullement modifiée par le contact des bactéries. Il estime que si d'autres auteurs ont obtenu des résultats différents, ceci serait le fait de différences de technique. Pour lui, la salive filtrée ne possède aucun pouvoir bactéricide. La salive fraîche, par contre, détruit le staphylocoque doré et le blanc, les sarcines, le bacille d'Eberth (culture de 5 jours, avec une culture de 18 heures on n'obtient qu'une diminution du nombre).

L'essentiel de l'effet de la salive dépend des sucs des glandes muqueuses. Les glandes parotide et sous-maxillaire ont également une action bactéricide, mais plus faible.

Metschnikoff, le savant le plus représentatif de l'immunologie de cette époque, caractérise, dans son ouvrage fondamental *De l'immunité et des maladies infectieuses*, l'ensemble des travaux relatifs à l'action bactéricide de la salive de la façon suivante :

*La nature n'emploie pas de substances antiseptiques pour protéger la peau et les muqueuses. Les liquides qui humectent la surface de la bouche et les autres muqueuses ne sont pas bactéricides, ou très faiblement, et alors il s'agit plutôt d'un cas exceptionnel. La nature déterge la muqueuse et la peau en éliminant une grande partie des microbes par desquamation épithéliale et en les expulsant par les sécrétions liquides et les excrétions. La nature, comme les médecins actuellement qui remplacent l'antisepsie en bouche, pour l'intestin et d'autres organes, par des lavages au sérum physiologique, a choisi cette méthode purement mécanique*²⁰⁴.

DEUXIÈME PARTIE — RECHERCHES DEPUIS 1900

L'étude des leucocytes^{35, 298}. — Depuis 1900 et en grande partie sous l'influence des travaux de l'école de Metschnikoff, l'étude du problème du pouvoir bactéricide de la salive va être poussé dans une direction bien définie. Toutes ces notions nouvellement découvertes pour le sérum vont orienter de plus en plus les chercheurs vers cette idée-force : faire la preuve d'un mécanisme spécifique responsable du pouvoir bactéricide. Cet effort soutenu pendant 20 ans aboutira en 1922 à la découverte de Fleming. Lui-même rappelle dès sa première

communication tout ce qu'il doit à ses prédécesseurs. Les mécanismes différents précédemment découverts seront donc, pour quelques années, rejetés dans l'ombre, sans pour autant qu'ils manquent de défenseurs.

Vers 1900, on se trouvait en présence de *deux théories* en apparence opposées : d'une part, celle toute-puissante de Metschnikoff, selon lequel toute la défense antimicrobienne de l'organisme relève uniquement de la *phagocytose* et, d'autre part, la *théorie humorale*. Tout en ne pouvant nier la première, ses défenseurs estimaient cependant qu'il doit exister dans les humeurs des principes bactéricides susceptibles d'être rendus responsables de la défense microbienne (Buchner ⁴¹-Nuttall). Ces deux théories, qui suscitèrent au début de violentes polémiques, loin de s'opposer, se concilièrent admirablement le jour où l'on découvrit le pouvoir opsonique des humeurs (Wright - 1903) et la distinction entre microbes saprophytes, sensibles en général au pouvoir bactéricide humoral, et microbes pathogènes justiciables de la phagocytose.

C'est sur l'étude des qualités physiologiques des *leucocytes* que vont se concentrer les recherches et, vu leur nombre dans la cavité buccale, sur leur rapport avec le pouvoir bactéricide du liquide buccal.

On avait tout d'abord considéré les leucocytes comme source d'alexines. A première vue, cela paraissait vraisemblable. Leur action permet en effet de transformer des vibrions cholériques en granulations ; or, dans le protoplasme phagocytaire, on retrouve précisément ces mêmes granulations. En fait, on a reconnu, par la suite, que cette hypothèse était fausse, comme l'était celle de Metschnikoff, les rendant responsables de la bactériolyse spécifique (phénomène de Pfeiffer). Pfeiffer et d'autres auteurs leur dénièrent tout rôle aussi bien dans l'infection que dans l'immunité.

Malgré cela Bail ¹⁵ ¹⁸ et Petterson continuent leurs recherches et constatent que chez les animaux immunisés contre le charbon (poule, chien) les leucocytes sont fortement actifs ; le sérum, par contre, privé de ses éléments cellulaires par centrifugation, était inactif. Il s'agissait donc de la diffusion d'une substance à partir de ces cellules. A l'aide de ces faits, Petterson peut expliquer la résistance du cobaye contre le *B. proteus*, celle du lapin contre les streptocoques et pneumocoques. Petterson désigne cette substance active dans les cellules sous le nom d'*endolysine* ²²⁸, ²²⁹.

Pour Schneider ²⁶⁷ et ses collaborateurs, les leucocytes seraient actifs contre un grand nombre de microorganismes. L'action bactéricide des leucocytes, affirmée dès le début par Denys et Leclef, Buchner, etc., s'est ainsi maintenue ; les conclusions doivent simplement en être modifiées. En tout cas, l'action bactéricide des leucocytes est indépendante de celle du sérum. Pour Metschnikoff, son mode d'action serait uniquement phagocytaire, d'après Denys ⁵⁴, Leclef et Buchner ⁴¹, par sécrétion de substance bactéricide, ce que confirme Laschenko ¹⁶⁷ et Tronsdorff ²⁷⁷. Cependant, Metschnikoff et Schattenfroh ²⁶² pensent plutôt à une libération de produits après la mort des leucocytes. C'est ici qu'intervient la notion d'*opsonine*, substance qui favoriserait le contact entre les bactéries et la substance bactéricide ; il en existerait même d'autres qui ou bien créeraient cette possibilité ou bien la renforceraient : *les substances leucotactiques*.

Il semble avant tout que les leucocytes agissent en tant que cellules vivantes dont les qualités seraient les suivantes :

1. Par phagocytose, qualité essentielle permettant la bactériolyse.
2. Par sécrétion d'une substance extra-cellulaire, celle-ci s'effectuant après une certaine excitation provenant de substances existant dans l'entourage des leucocytes ; ce sont les *leucines* de R. Schneider (1909) ²⁶⁷.

L'élément essentiel se trouve avant tout dans la bactérie, l'expérience suivante le démontre : si l'on ajoute des leucocytes broyés à une suspension de bactéries, il se produit une lyse : c'est de *l'aphagocydie*.

Les travaux subséquents de Blum et Hausmann ^{32, 125} ont démontré l'identité des *leucines* (Schneider) et des *endolysines* (Pettersson) ; ils les obtiennent non seulement par excitation de leucocytes vivants, mais également par extraction de leucocytes morts. Ces extraits ont des propriétés identiques ; en voici quelques-unes :

Thermostabilité : ils résistent parfaitement à une température d'environ 80°, ils supportent sans dommage une chaleur de 55° à 60° pendant 30 à 60 minutes.

Ils conservent longtemps leurs propriétés et résistent à la dessiccation.

Ils ne franchissent pas les bougies, même très poreuses ; ils sont précipitables par l'alcool (Pettersson) ²²⁹ et ^{ss.}, l'éther (Kling), le sulfate d'ammonium (Manwaring) ¹⁸².

Ils sont aisément absorbés par les matières inertes, noir animal, craie, kaolin, silice colloïdale.

Toutes propriétés ressemblant étrangement au lysozyme de Fleming, identité dont l'hypothèse a été formulée par Knorr (1929) et définitivement admise à la suite des travaux de Barnes en 1940²⁰.

Voici encore quelques propriétés communes : elles agissent mieux en milieu acide qu'en milieu alcalin. Elles agissent spécialement contre les bacilles G+.

Elles se comportent comme des protéines et sont inactivées par certains colloïdes.

Il faut également citer les études remarquables de Weil et Suzuki^{298, 281}. Etudiant l'effet de la substance bactéricide des leucocytes sur des germes saprophytes aériens et de l'eau, ils constatent, à part la phagocytose, *une action extrêmement forte même en solution très diluée*. Cette substance n'adhère pas très fortement au corps des leucocytes et peut facilement en être séparée. Elle est sécrétée soit spontanément, soit par une excitation bactérienne. L'importance du milieu reste considérable, les bactéries résistantes ne sont lysées que par le milieu le plus favorable (présence de facteurs adjuvants). Il n'y a pas de spécificité de la substance, la variété des actions s'explique par l'intervention de *deux substances*, l'une très soluble et l'autre fortement liée au corps des cellules. Suzuki confirme ces constatations.

Une série d'auteurs se sont occupés depuis de ces extraits leucocytaires et, par extension, d'extraits de tissus et d'organes divers.

Conradi⁴⁸ montre qu'on peut extraire de tissus et d'organes autolysés une substance bactéricide. Ses propriétés sont : thermostabilité à 100°, filtrabilité. Elle n'est pas adsorbée au charbon, elle est soluble dans l'alcool et le pH n'exerce aucun effet.

Gengou¹⁰⁵, en 1921, extrait également une substance bactéricide ; elle serait inhibée par le sérum inactivé et le liquide d'ascite, elle serait complètement adsorbée par tous les microbes qu'elle est capable de dissoudre.

Turro (1921)²⁸⁹ décrit une substance bactéricide, extraite également d'autres tissus, dont l'effet s'exercerait spécialement sur *B. anthracis*.

Kuttner (1921)¹⁶¹ trouve une substance lysante dont les propriétés se rapprochent fortement de celles du bactériophage de d'Herelle et Tword.

Citons, pour terminer, les travaux de Laschenko (1909), Rettger et Sperry (1911)²⁴⁷ sur le blanc d'œuf de poule : on avait proposé

cette substance comme milieu de culture ; or, l'expérience prouve que les microbes ne s'y développent que très difficilement. On peut le laisser exposé à l'air libre pendant très longtemps sans qu'aucune altération ne se produise. Il semble donc y avoir un mécanisme d'auto-protection de l'œuf pour le cas où la coquille serait lésée. En mettant directement en contact des cultures pures de différentes bactéries avec des gouttes de blanc d'œuf à des dilutions variables, il retrouve toujours ce même pouvoir bactéricide.

Ses conclusions sont les suivantes : il semble qu'il s'agisse d'une *enzyme protéolytique*, thermostable jusqu'à 60°.

Son action est très nette sur toute une série de microbes : *B. subtilis*, charbon, zenker, zopfi, megatherium, mycoïdes, ramosus.

On constate un effet faible sur *B. pyogènes*, par exemple, enfin un effet nul sur : *B. proteus*, *prodigiosus*, typhus, choléra et coli.

C'est sur ces bases que Fleming, en 1922, nommait et décrivait son lysozyme, entrevu certainement par les auteurs ci-dessus.

L'action des sulfocyanates. — Leur existence a été constatée par Berzelius déjà, puis par Claude Bernard ; ces auteurs ne leur attribuent pas de rôle précis ; pour Claude Bernard, ils seraient dus à la carie. Depuis les travaux de Hugenschmidt¹³³, il est de mise de nier leur action bactéricide dans le milieu buccal. Malgré cela, il faut réserver son opinion. En effet, ils ont toujours trouvé de nouveaux défenseurs ; spécialement ces dernières années, une série de recherches ont été effectuées tendant à prouver qu'ils jouent tout de même un rôle, sinon dans le liquide buccal, du moins dans le tractus gastro-intestinal, spécialement dans *l'estomac*.

L'étude théorique, chimique et bactériologique *in vitro* a été entreprise par Lockemann et Ullrich (1930-1932)^{172, 177} ; ces travaux très approfondis méritent qu'on s'y arrête quelques instants.

Ils sont fondés sur les travaux d'Edinger, puis d'Edinger et Treupel^{77, 78} qui utilisaient des solutions de 1/8 à 1/16 % de chinolin rhodan et réussissaient à obtenir une inhibition et même la lyse de culture de BK et de B de la morve, mais aucun effet per os ou en injections sous-cutanées. Les auteurs commencèrent par définir exactement leurs caractéristiques chimiques.

Les sulfocyanates sont à placer immédiatement à la suite des halogènes ; ils présentent en effet les mêmes caractéristiques, mais plus accentuées.

Ils produisent la lyse de :

B. coli par une solution de 0,25 N ou 2,03 % en 48 heures.
B. paratyphus B. par une solution de 0,5 N ou 4,05 % en 24 heures.
Staphylocoque par une solution de 1,0 N ou 8,1 % en 24 heures.

Toutes des concentrations qui ne se rencontrent nulle part dans l'organisme. Par contre, la présence de ions H *augmente fortement* leur action bactéricide. L'expérience montre que HCL + une solution de 0,007 % NaCNS produit une augmentation du pouvoir bactéricide de 4 à 16 fois. La forme H (CNS) est la plus puissante. Il y a lieu de remarquer que ce pouvoir bactéricide très considérable ne repose pas sur le pouvoir de dissociation électrolytique. Il s'agit plutôt, d'après ces auteurs, d'une action synergique des ions H libres et des ions CNS libres ou non. On peut la considérer comme une action catalytique réciproque. Elle exerce une action maximum sur les formes sporulées du B. charbon. Ils étudient également l'effet des ions OH; la présence simultanée de ions OH et CNS provoque un effet bactéricide augmenté; ceci aussi bien sur les formes de croissance de bactéries que sur les formes stables. Cependant, le renforcement du pouvoir bactéricide par les ions OH est sensiblement moins grand qu'avec les ions H. Une fois l'augmentation obtenue, l'addition de nouvelles quantités de base n'amène aucune diminution de l'effet, comme cela se produit en présence de la bactérie charbonneuse. La résistance des formes de croissance envers la solution acide ou alcaline de CNS diffère non seulement selon l'espèce, mais également et considérablement envers les différentes souches d'une même espèce.

Etudiant l'action du CNS dans le liquide buccal, F. Spengler²²⁷, en 1935, constate une action inhibitive nette pour une culture de staphylocoque ou de B. coli, additionnée de CNS + HCL, aucun effet pour une culture identique additionnée séparément ou de HCL ou encore de liquide buccal. Il en concluait que les sels de CNS étaient certes responsables de l'action bactéricide du liquide buccal, mais en présence d'ions H seulement.

Ces études, théoriques avant tout, ont amené divers essais d'application pratique. Tout d'abord Lockemann, en collaboration avec Ullrich^{174, 176} en 1936, puis avec Heinken en 1937¹⁷⁷, s'efforcèrent de l'appliquer au BK et de créer une nouvelle méthode de désinfection des crachats. Ils constatent d'emblée une action très favorable, beaucoup plus puissante que celle des acides habituels, surtout par adjonction de ions OH- (lyse par une solution de 0,01 N, ce qui

correspond à 0,059 gr. par dl. en 24 heures). Séparément NaCNS et NaOH sont sans effet sur le BK jusqu'à une teneur de 32 gr. par dl. L'action de NaCNS en solution acide est encore supérieure à la solution aqueuse alcaline. On a constaté cependant des échecs imprévus. Les auteurs recommandent dans leur troisième communication ¹⁷⁴ de 1936 un procédé de stérilisation des crachats en deux temps :

a) Action de la solution NaCNS alcalinisée pour mettre à nu le BK en lysant les masses muqueuses tenaces.

b) Action de la solution acide.

Dans leur quatrième communication de 1937, ils confirment ces résultats, mais estiment l'action de la solution acide très sûre et suffisante (lyse en 5 à 30 minutes).

Ces constatations ont été étendues au liquide buccal par J. Zeyland et E. Piasecka-Zeyland (Posen) ³¹⁰. Ils montrent en 1937 *l'action inhibitrice* du liquide buccal sur le BK. En 1938, les expériences sont poursuivies avec des cultures pures sur des cobayes : les résultats confirment cette action bactéricide pour le BK.

Pour eux, ce facteur bactéricide serait dû à la présence du CNS dans le liquide buccal. En utilisant une concentration strictement physiologique (0,007-0,01 %) les effets sont très nets.

Ces résultats permettent au moins en partie d'expliquer *la nature de la résistance non spécifique de la bouche* contre l'infection tuberculeuse et indiquent la possibilité d'utiliser le NaCNS dans la thérapie et la prophylaxie de la tuberculose.

Brinck, en 1933 ³⁸, met en évidence l'importance de l'action du CNS dans l'estomac. L'examen de plus de 200 patients montre l'effet germicide considérable de ces sels associé à l'action des ions H libres. Il note une action particulièrement forte sur les bactéries G-.

Berge (Oslo), en 1938 ²⁵, étudie l'effet des sels de CNS (du liquide buccal) sur la force de croissance du *Lactobacillus acidophilus*. Il constate une action bactéricide nette en milieu acide. A part le liquide buccal, on en trouve dans le sang, le lait, les sécrétions et les excréments.

D'après lui, on en trouverait également dans les fruits de diverses espèces, à noyau et à pépins ; les œufs en contiendraient beaucoup.

Il confirme leur appartenance chimique aux halogènes. D'après les données actuelles, en particulier son action inhibitrice sur la croissance du *Lactobacillus acidophilus* en milieu acide, il faudrait le considérer comme l'un des *antagonistes de la carie*.

Reid, Anderson, Stubblefield et Joy²⁴⁴ découvrirent fortuitement l'action inhibitrice du NaCNS contre l'absorption de toxine dysentérique (Shiga) chez le chien et le lapin. Il faut au moins une semaine entre l'absorption de la dose de NaCNS (lapin : 20 mgr. par kg. ; chien : 200 mgr. par kg.) et celle du filtrat. Le mécanisme de son action n'a pas été élucidé ; il n'y a ni combinaison ni neutralisation du principe toxique. Pour l'homme, les auteurs proposent 20 mgr. par kg. de NaCNS (D. M. S. : 1 gr. en solution de 1,5-2 % en injection intra-veineuse). La protection obtenue durerait un mois.

Enfin, Tarabuchin (Moscou) en 1933²⁵² proposait le CNS pour le traitement des cancers cutanés. Le sulfocyanate de potassium détruirait entièrement les tissus malades. Il le recommande spécialement pour le traitement du cancer cutané, pour les tumeurs bénignes cutanées (verruque et « Orientbeule »). Il cite 24 cas de guérison sur 25 cas traités de cancers cutanés.

On voit donc qu'il n'était pas inutile de revenir sur ce sujet, considéré par beaucoup comme résolu. A la lumière de l'expérimentation moderne, simplement chimique et même clinique, *l'usage des sels de CNS se révèle plein de possibilités nouvelles ; leur action physiologique nous apparaît ainsi sous un jour entièrement nouveau.* Les expériences actuellement connues sont encore peu nombreuses, nul doute qu'en les développant on obtienne des résultats bien supérieurs.

*L'antagonisme bactérien*¹¹¹. — On sait que très souvent des microbes différents introduits dans un même milieu se font une concurrence très forte. Rappelons que le fait avait déjà été décrit par Hugenschmidt¹³⁸ quant au liquide buccal. Cette lutte pour la vie a été très étudiée depuis lors, car elle présente un gros intérêt pour la clinique. On admet, en effet, que les microorganismes, en ce point particulier, se comportent sensiblement de la même manière *in vitro* qu'*in vivo*. Certains troubles de la flore normale jouent probablement un rôle important dans la pathogenèse des maladies infectieuses.

C'est ainsi qu'on peut distinguer :

1. Un antagonisme de croissance : l'espèce la plus vigoureuse, se développant le plus rapidement, étouffe l'espèce la plus faible.
2. Un antagonisme de fonction : dans le cas de deux espèces microbiennes, vivant très bien ensemble, mais chez lesquelles certains produits du métabolisme n'apparaissent pas, ou qui sont encore, immédiatement après leur apparition, digérées par l'espèce accompagnante.

Exemple : inhibition du pigment du pyocyanique en présence de cocci du pus. Enfin, il peut y avoir inhibition par suite de changement des conditions du substratum.

On pourra donc avoir soit :

- a) Un effet direct des microorganismes.
- b) Un effet indirect par les produits du métabolisme produisant une variation nuisible du pH du milieu, ou mettant en solution des produits directement antibactériens (pneumocoque : peroxyde-coli : formaldéhyde).
- c) Epuisement du milieu nutritif par l'espèce croissant le plus rapidement ;
- d) Lyse directe par une substance spécifique secrétée par les microorganismes : exemple : pyocyanase.

Citons cet aphorisme de Bail : *une espèce microbienne aura une vitalité d'autant plus grande qu'elle nécessitera un espace vital plus petit*. L'effet inhibiteur s'exerce non seulement électivement contre l'espèce propre, mais aussi contre celles qui lui sont parentes.

L'antagonisme bactérien produisant une lyse directe par une substance spécifique dépend naturellement d'une série de facteurs externes : la quantité de substance formée, les conditions de diffusion et d'absorption, etc., ou encore des microbes eux-mêmes, de leur nature spécifique.

Quelques exemples :

Streptocoque $\longleftrightarrow$ coli B diphtérique $\longleftrightarrow$ pyocyanique
 charbon $\longleftrightarrow$

Ces faits sont confirmés en 1935 par Neufeld ²¹⁹ qui distingue deux mécanismes : un effet de ferments et un effet lié aux agents vivants. L'effet antagoniste serait surtout conditionné par la possibilité de transformer les substances nutritives en une forme favorable au microbe en question, défavorable à son antagoniste.

Ces faits ont été observés également dans le liquide buccal : Milan Prica ^{238, 239}, étudiant l'action antibactérienne du liquide buccal sur les bactéries capsulées ne constate aucun effet inhibiteur ou lytique sur le bacille de Friedländer, le rhinosclérome, l'ozène. Par contre, il est capable d'amener *la transformation* de ces trois types microbiens en un type non capsulé. Le liquide buccal frais ajouté à de la gelose (20 à 50 %) gêne le développement microbien. La chaleur et la filtration provoquent la disparition de cet effet, une adjonction de liquide frais lui rend ces qualités. Par centrifugation, on localise

l'action inhibitrice dans le culot : additionné de noir animal et après passage dans un filtre de papier, l'effet disparaît.

Le liquide buccal frais exerce son pouvoir vis-à-vis de la culture sur gélose ; il diffuse à travers une couche de cellophane, le pouvoir antibactérien est pleinement conservé.

Les espèces autochtones ont une *action antagoniste* nette envers les bactéries capsulées. Pour Prica, l'action bactéricide est le fait de l'antagonisme bactérien, sans pour cela exclure d'autres mécanismes. Répétant ces expériences avec les staphylocoques, il constate une action antagoniste marquée des staphylocoques blanc et doré envers les trois bactéries précitées. Il ajoute qu'elle doit s'exécuter par l'intermédiaire d'un produit de sécrétion active, peut-être d'un produit du métabolisme du staphylocoque, thermostable et filtrable.

Ces faits ont été constatés également par Berg (1938) ²¹. Il estime qu'il s'agit bien d'un effet du liquide buccal proprement dit, mais précise qu'*in vitro* il faut une très grande masse de bactéries buccales pour obtenir un effet. Le liquide buccal inactivé ne peut être réactivé qu'en proportion de ce qu'on lui rajoute de liquide frais.

Muhlebach en 1938 ²¹⁶, toujours sans nier la possibilité d'autres mécanismes, constate d'abord la variabilité des qualités bactéricides du liquide buccal suivant les cas et même chez une même personne. Il cherche à établir le rôle des divers microbes de la flore buccale. La croissance des streptocoques est médiocre, dit-il, celle du micrococcus catarhalis nulle, celle des staphylocoques et du bacille diphtérique meilleure. Il constate la présence de bâtonnets sporulés. En somme, l'effet inhibiteur serait faible sauf pour le streptocoque : on en trouve de nombreux types dans la salive.

Gundel et Hinstedt ¹¹⁵ cependant décrivent un antagonisme entre le staphylocoque et le colibacille. En définitive, un *antagonisme* microbien net entre certains streptocoques, désigné par l'expression suivante : « Vergrünende Kokken mit antagonistischer Wirkung », et le bacille diphtérique, les staphylocoques. Toutefois, il ne put en faire la preuve pour ceux-ci. Il semble que l'inhibition provoque une stérilité sans tuer directement les germes. Enfin il diffère suivant les souches, varie dans le temps pour une même souche, peut finalement faire complètement défaut. Son action peut être fortement troublée, voire même supprimée totalement par une souillure de la culture.

Le travail le plus récent est celui de Hegemann (1942) ¹²⁷ ; il est basé sur celui de Muhlebach. Pour lui, la présence de ces cocci à

action antagoniste est déterminante. En effet, dit-il, si l'on dépose sur une plaque de gélose-ascite, ensemencée de bacilles diphtériques, quelques gouttes de liquide buccal, il se développe deux sortes de colonies :

a) Des cocci à action antagoniste déjà mentionnés (visibles sur la culture sous forme de colonies claires et transparentes).

b) D'autres microbes de la flore buccale (cocci G.- et bâtonnets).

Ces cocci à action antagoniste possèdent un pouvoir inhibiteur ; leur effet, plus ou moins grand, se marque par une zone d'inhibition correspondante, transparente. Celle-ci est toujours proportionnelle à la grandeur des colonies.

Hegemann affirme que le pouvoir antagoniste de ces cocci est seul responsable du pouvoir bactéricide du liquide buccal ; en cela il dépasse nettement les conclusions de Muhlebach.

Ses arguments sont les suivants :

1. Les cocci sont présents dans tout liquide buccal inhibiteur frais.
2. Leur destruction entraîne la disparition de ce pouvoir inhibiteur.
3. Ce pouvoir est rétabli lorsqu'on les rajoute dans la solution.

Pour conformer ces expériences strictement à la réalité, il procède à des numérations de la flore buccale par la méthode de la cellule à compter. Il obtient des résultats sensiblement différents de ceux de Berg : 20 à 30 millions de germes par cm^3 dont les $2/3$ environ sont formés par les cocci antagonistes.

Il ensemence directement du liquide buccal frais, procédé plus près de la réalité, plutôt que d'ensemencer un mélange de bactéries (de la flore buccale) obtenu sur culture ; la numération donne des chiffres conformes aux moyennes trouvées en bouche, le pouvoir antagoniste est conservé : il est le fait de ces cocci. Par le procédé de l'ensemencement de bactéries obtenues sur culture, on constate un pouvoir antagoniste diminué, le développement microbien sur milieu artificiel étant probablement différent de celui du milieu buccal.

Le pouvoir antagoniste agit à travers la cellophane ; il serait actif contre les mêmes espèces microbiennes que le pouvoir bactéricide du liquide buccal total. Il conclut en affirmant qu'il est parfaitement inutile d'invoquer d'autres mécanismes (lysozyme, inhibines, etc.) ; *le pouvoir antagoniste de la flore buccale, respectivement des cocci à pouvoir antagoniste, est seul en cause.*

A cette opinion quelque peu excessive, nous opposerons celle de Knorr¹⁵⁴, Weigmann et Hölzl²⁹³, qui, tout en confirmant la présence

d'un certain pouvoir antagoniste bactérien en général et la présence de ces cocci, en particulier, estiment cependant qu'il ne joue *qu'un rôle modéré* nullement responsable de l'ensemble de l'effet bactéricide du liquide buccal et qu'on doit envisager à côté de lui d'autres mécanismes : *le lysozyme et les inhibines*, dont l'action leur paraît être de toute importance.

L'O. R. L. française admet traditionnellement une action bactéricide des mucus nasal, bronchique et vaginal en se basant sur le travail de Wurtz et Lermoyez — Soc. biol. 15 juillet 1893.

CHAPITRE III

LE PHÉNOMÈNE DE FLEMING : LE LYSOZYME

Par une communication du 12 février 1922, Sir Alexandre Fleming⁸⁷ attirait l'attention des membres de la Société royale de Londres sur une substance présente dans les tissus et les sécrétions du corps et qui jouit de la remarquable propriété de lyser extrêmement rapidement certaines bactéries. Il la désigne sous le nom de lysozyme, vu qu'elle lui semble avoir des propriétés proches de celles des ferments.

Origine de cette découverte. — Elle fut découverte fortuitement au cours de recherches faites pour un patient atteint de coryza aigu.

Dans le but d'étudier la bactériologie de cette affection, il fit faire des cultures, sur gélose au sang, de mucus nasal. On fit des prélèvements chaque jour et pendant les trois premiers jours, il n'y eut aucune croissance visible, à l'exception d'une colonie de staphylocoques. La culture faite avec le prélèvement du quatrième jour montra après 24 heures une grande quantité de petites colonies, qui se révélèrent être formées par un grand coccus G +, disposé irrégulièrement, avec une certaine tendance à se placer en diplocoques ou en formation tétraédrique. C'est avec ce microbe que toutes les expériences ont été faites.

La colonie au maximum de développement peut atteindre environ 2 mm. de diamètre ; elle est ronde, opaque et surélevée ; elle a une couleur jaune citron, brillante ; elle présente une croissance exubérante sur tous les milieux ordinaires, elle s'effectue normalement à température ordinaire ou à l'étuve à 37°. Ce microbe est aérobic et facultativement anaérobic ; il ne liquéfie pas la gélatine ni ne coagule l'albumine.

L'auteur l'appelle *micrococcus lysodeicus*.

Voici le fait expérimental primitif, base de sa découverte : on mélange une partie de mucus nasal, prélevé chez un patient souffrant

de coryza aigu avec 5 parties de solution salée normale ; on centrifugea le tout. On préleva alors une goutte de liquide de centrifugation et on le déposa sur une plaque de gélose, fortement ensemencée au préalable avec du micrococcus lysodeicus ; la plaque fut mise à l'étuve à 37° pendant 24 heures et l'on constata un développement considérable du coccus, sauf dans toute la région où la goutte de liquide de centrifugation avait été placée. Il y avait *une inhibition* complète de la croissance et celle-ci s'étendait sur une zone d'environ 1 cm. au delà et sur tout le pourtour de la goutte.

Ce résultat remarquable amena d'autres recherches ⁸³ et c'est ainsi que l'on put constater la lyse d'une épaisse suspension de cocci dans une éprouvette par l'adjonction de mucus nasal dilué à 37°, ceci en quelques minutes.

Dès lors, la voie est ouverte pour l'étude de ce nouveau mode de protection antibactérienne ; Fleming, Allison et ses collaborateurs d'abord, puis, en Allemagne, Andersen, Wolff, Nakamura, etc., cherchèrent à élucider *les propriétés* du lysozyme ; en Amérique, Meyer et ses collaborateurs s'efforcèrent d'obtenir de la *substance pure* et c'est en U. R. S. S. qu'on en tira *les conclusions pratiques* en essayant de l'appliquer à la clinique et à la thérapeutique des affections qui y semblent les plus favorables.

PROVENANCE

Dès les premières expériences, on a vu que le mucus nasal n'était pas seul à contenir du lysozyme, les larmes et la salive en contiennent également passablement. On s'est ainsi peu à peu rendu compte qu'un grand nombre d'organes et de tissus du corps humain en possèdent à des titres divers. C'est avant tout à l'aide du micrococcus lysodeicus que ces déterminations ont été faites ; son extrême sensibilité permet en effet de déceler des quantités infimes de lysozyme. On a procédé en général de la façon suivante :

Dans une éprouvette, on met une forte émulsion de micrococcus lysodeicus, on y ajoute une parcelle de l'organe à examiner, de la grosseur d'un pois fendu (Fleming), on place le tout à l'étude à 45° et l'on constate l'action lytique par l'éclaircissement de la solution. On a expérimenté sur des tissus morts ou vivants, puis les recherches ont été étendues à l'ensemble du règne animal et végétal. Un

tableau de Fleming, complété par les données les plus récentes de Ridley ²⁵², Kigasawa ^{144, 145}, Wolff ³⁰⁶, Florey ⁹⁷ et Goldworthy ¹¹⁰, Jelmoljeva et Bujanowskaja ^{137, 138}, Kimura ¹⁴⁶, Cavka et Prica ⁴⁵, donnera une vue d'ensemble.

TABLEAU DE LA RÉPARTITION DU LYSOZYME

Chez l'homme :

Normalement :

Larmes, mucus nasal, salive, crachats, sérum sanguin, plasma sanguin, leucocytes, sperme, liquide synovial, cartilage, cheveux, estomac, côlon, foie, rate, reins, surrénales, cœur, cerveau, muscles, ovaires, testis, ganglions lymphatiques, glandes salivaires, poumons.

A l'état pathologique :

Liquide d'ascite, liquide pleural, hydrocoel, liquide de kyste ovarien, cebum, pus de pustule d'acné, séro-pus d'un abcès froid de l'espace poplité, urine contenant de l'albumine et du pus.

N'en contiennent pas :

Urine normale, liquide céphalo-rachidien, sueur, humeur aqueuse et cristallin.

Chez les animaux :

En contiennent :

Cobaye : tissus en général, foie, poumons, muscles, glandes salivaires et ganglions lymphatiques, reins, rate, surrénales, estomac, intestins, côlon, leucocytes, sécrétion stomacale et duodénale, testicules et ovaires, cartilage.

Chèvre : larmes, mucus nasal, salive, sécrétion du côlon.

Lapin : salive, sécrétion stomacale et du côlon, estomac, côlon, foie, rate, reins, surrénales, poumons, ganglions lymphatiques, glandes salivaires, cœur, ovaires.

Rat : larmes, cerveau, poumons, foie, reins, rate, estomac, côlon, testis, glandes salivaires.

Chat (pourcentage très faible) : salive, rate, reins, poumons, estomac, glandes salivaires, ganglions lymphatiques.

Chien : tissus en général, sécrétion stomacale et du côlon, estomac, côlon, reins, rate, foie, poumons, cœur, cerveau, muscles, ganglions lymphatiques, surrénales, glandes salivaires, salive, larmes, mucus nasal.

Poissons : œufs (Fleming 1932) ⁹² ; dindon : larmes, blanc et jaune d'œuf.

N'en contiennent pas :

Rat : larmes ; chat : larmes, sécrétion stomacale et du côlon ; cobaye : larmes ; chèvre : salive ; chien : estomac et côlon ; dindon : salive ; lait de vache, frai de grenouille et de poisson (Florey, Margraith, Roberts et Bordet ^{255, 30}).

Règne végétal :

En contiennent :

Navet (8 u), oignon, radis, rave, raifort, chou-fleur, chou (50 à 100 u), rutabaga.

N'en contiennent pas :

Jus de rave (jaune et rouge) (Kigasawa), jus de feuille verte, robinia, feuille de chou-rave, jus de fruits mûrs (abricot, pomme, poire, pomme de terre, chou-rave, oignon, orange, banane, prune, betterave, carotte, épinards, panais, pois, haricot vert et laitue.

Le lysozyme est donc un corps *très répandu* dans les règnes animal et végétal ; en somme on peut dire que tous les tissus et organes possèdent un certain pouvoir lytique, même un cheveu. L'épiderme, la membrane bordante du tractus respiratoire et spécialement les tissus parenchymateux (fibrine, tissus graisseux, cartilage) en contiennent énormément. Le cartilage, par exemple, lyse à 45° en 5 minutes en solution à 1/1500 une suspension *M. lysodeicus*, ce qui correspond à une concentration de 1/10 pour les larmes. Dans le sang également, la fibrine, les leucocytes, plasma et globules rouges en contiennent, de sorte qu'on pourrait l'envisager comme un *mécanisme de protection accessoire* pour les plaies ouvertes. Celles-ci se couvriraient rapidement de fibrine et de leucocytes riches en lysozyme ; pour Ridley la teneur des leucocytes est aussi grande que celle des larmes. En général, les larmes, le crachat et le sérum sanguin chez un même individu ont une teneur en lysozyme remarquablement constante sauf pour la salive où les variations sont considérables ; sa concentration n'atteint jamais celle des larmes. Celles-ci ont sans contredit la teneur la plus élevée et, fait qui paraît digne de remarque, il apparaît dans les larmes déjà après quelques secondes d'excitation. Il existe donc des cellules capables d'élaborer très rapidement une énorme concentration de lysozyme ou de le concentrer à partir du sang.

Le blanc d'œuf, pratiquement la seule source de lysozyme utilisable, soit en quantité, soit en qualité, a spécialement été étudié par Fleming et Allison ⁹⁴.

Ces auteurs ont commencé par prouver l'identité du ferment protéolytique de Laschenko¹⁶⁷ et du principe décrit par Rettger et Sperry²⁴⁷ en montrant que les microbes sensibles à l'un l'étaient également à l'autre, placés dans des conditions identiques. Ils mirent en évidence le pouvoir lytique extraordinaire du blanc d'œuf, décelable encore pour une concentration de 1/50.000.000, donc de loin supérieur à n'importe quel antiseptique connu; même à l'état sec, la teneur reste élevée.

Etudiant des blancs d'œufs de diverses espèces (poule, grive, bergeronnette, poule de Bruyère), ils constatent qu'ils présentent des différences marquées entre eux. La digestion peptique n'a aucun effet sur le lysozyme du blanc d'œuf.

L'étude du jaune d'œuf a montré qu'il exerçait une action inhibitive sur le pouvoir antibactérien du blanc d'œuf, ce qu'avaient prévu Rettger et Sperry. Les auteurs ont même essayé une application pratique : l'ingestion de blanc d'œuf de manière à agir sur la flore intestinale, sans résultat bien sûr (d'ordre plutôt psychologique); en injection intraveineuse, il pourrait avoir une utilité en cas de septicémie à streptococcus faecalis.

A part les oiseaux, les poissons (brochet) ont également du lysozyme. Leur cartilage est aussi puissant que celui de l'homme, leur œufs ont également une teneur très élevée. Chez les animaux supérieurs, le lapin et le cobaye en ont beaucoup moins que l'homme, c'est le chien qui s'en rapproche le plus.

Chez les végétaux, la teneur est en général très faible si tant est qu'elle existe; le navet, pour Fleming⁹³ aurait la teneur maximale, ce qui est contesté par Kigasawa¹⁴⁵, mais il s'agit probablement de différences de souches ou de variations saisonnières. Quoi qu'il en soit, les résultats sont très contradictoires.

Notons encore que les organes et tissus qui paraissent les plus riches en lysozyme sont en général ceux auxquels les moyens de défense habituels de l'organisme font défaut.

SON RAYON D'ACTION

Micro-organismes touchés

Pour toutes ces expériences, Fleming utilisa la bactérie décrite et découverte par lui : le micrococcus lysodeicus, un germe aérien; mais dès que les propriétés du lysozyme furent établies, il parut logique de voir si elles s'appliquaient également à d'autres espèces microbiennes.

De nombreux essais lui permirent de distinguer trois classes⁸⁷:

1. Il étudia d'abord un groupe de 104 germes captés dans l'air du laboratoire ; sur ce nombre, 75 % étaient détruits plus ou moins vite par une solution de 1/100 de crachat (cocci divers, bacille, moisissure, levure). Remarquons que déjà Weil et Suzuki avaient opéré sur des germes aériens ; notamment sur des sarcines ; le germe décrit par Bordet³⁰ (sensible au lysozyme), un bâtonnet, était également un germe aérien. Précisons cependant que tous les germes aériens ne sont pas affectés par le lysozyme (Kigasawa)¹⁴³ ; on constate parmi eux des différences notables dans la lyse. Il ne semble pas y avoir de règle quant à cette sensibilité ; il n'y a aucune différence entre microorganisme G⁺ ou G⁻, ni entre pathogènes et saprophytes : elle est absolument imprévisible. Les germes aériens ont simplement le pourcentage de sensibilité le plus élevé.

2. La seconde classe comprend des cultures de microorganismes pathologiques pour certains animaux, inoffensifs pour l'homme. Utilisant des solutions de larmes au 1/100 ou de mucus nasal au 1/100 et des extraits de crachats, il obtient dans 7 cas sur 8 une lyse perceptible. Ce groupe comprenait entre autres le bacillus abortus Bang et le bacillus pseudotuberculosis rodentium.

3. Ce groupe comprenait des bactéries isolées à partir du corps humain. Le résultat fut presque nul : quelques-unes furent lysées, la plupart ne présentèrent aucun effet. Le groupe B. typhique-B. coli ne présente aucune lyse. Des expériences ultérieures (1929)⁹¹, par le même auteur, ont montré que s'il n'y avait pas de lyse perceptible, il y avait cependant un effet inhibiteur tuant tout de même ces bactéries.

Des volumes égaux d'une solution diluée de larmes et d'une suspension de B. coli sont mélangés dans une éprouvette et portés à l'étuve à 45° pendant une heure. On prélève alors 10 cc., on les ensemence et l'on fait le compte des colonies de B. coli.

Sol. dil. de larmes :

titre	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Témoin
Nombre de colonies (coli) ...	13	13	21	26	30	42	182

L'effet inhibiteur ne fait aucun doute. Le groupe des streptocoques intestinaux est également relativement sensible (16 lyses sur 19).

Tableau montrant l'action du lysozyme (crachats et larmes) sur des bactéries isolées à partir du corps humain.

<i>Microbes</i>	<i>Nombre</i>		<i>Non lysés</i>
	<i>total</i>	<i>Lysés</i>	
Typhosus	1	0	1
Streptocoques	22	16	6
Paratyphus	2	0	2
Staphylocoques	4	2	2
Proteus	2	0	2
Coli	12	0	12
Pyocyanique	3	0	3
B. pestis	1	0	1
B. melitensis	1	0	1
B. diphtéroïdes	3	0	3
Pneumocoques	2	0	2

D'après Ridley ²⁵², l'action inhibitrice a également été démontrée sur le staphylocoque, streptocoque, coli, bactérie charbonneuse et B. typhique ; on aurait donc une certaine action sur des germes pathogènes. Un certain nombre d'auteurs n'ont pas confirmé ces résultats : (Kigasawa) ¹⁴⁵, même en utilisant du blanc d'œuf à 1/10, de même Andersen ⁹, Du Dcheng Hsing ⁷⁴ et Neisser ¹⁵⁵. Ces auteurs cependant pensent à l'action lysante, alors que Ridley ^{251, 252} précise bien : « inhibitory effect », il semble donc y avoir confusion.

Wolff ³⁰⁶, reprenant cette question, réaffirme l'action du lysozyme sur les germes pathogènes ; en voici les résultats :

<i>Microbes</i>	<i>Action</i>
Staphylocoques	++
Streptocoques hémolytiques	++
Streptocoques viridans ...	—
Pneumocoques	—
Charbon	+
Meningocoques	++
Gonocoques	+++
Coli	—
B. typhique	+
B. diphtérique	—
B. K.	++

Dans un autre travail, Fleming⁹² avait affirmé spécialement l'action du lysozyme de leucocytes sur le gonocoque; il fut à l'époque fortement attaqué par Bordet; d'après celui-ci, le gonocoque ne serait pas attaqué ni par les larmes ni par le blanc d'œuf, ce qui témoignerait au plus pour une action différenciée des lysozymes de diverses provenances et pourrait être considéré comme l'expression de l'immunité particulière de certains tissus vis-à-vis de certaines infections. Dès 1929, Fleming note d'ailleurs cette variabilité d'action du lysozyme suivant sa provenance. Ainsi les larmes, dont l'action est la plus puissante sur le *M. lysodeicus*, sont nettement moins actives sur d'autres microbes, contre lesquels, par contre, le crachat ou le liquide synovial sont très actifs. Ces vues ont été confirmées récemment par Jelmoljewa et Bujanowskaja en 1938¹³⁷. Ces deux auteurs notent une action positive aussi bien aérobie qu'anaérobie (légèrement plus faible); en particulier sur le charbon, le gonocoque est nettement lysé.

Pour Gohar¹⁹, le lysozyme lyse les formes végétantes de certaines bactéries formant des spores et inhibe leur croissance, mais est inefficace envers les spores elles-mêmes.

*Pouvoir lytique du lysozyme d'après Gohar*¹⁰⁹

<i>Bactéries</i>	<i>Lyses</i>
Megatherium	incomplète
Subtili	incomplète
Mesentericus	complète (1/64)
Staphylocoque doré	incomplète
Staphylocoque citron	incomplète
Micrococcus catarrhalis	aucune
Meningocoque	
Pyocyanique	très faible
Prodigiousus	très faible
Gonocoque	très faible
Divers champignons	aucune

Melnik et, Netchajewski-Starabinetz en 1935^{194, 198}, au cours d'expériences destinées à l'utilisation pratique du lysozyme, constatent une lyse des microbes suivants: perfringens, oedematiens, vibron sceptique, histolyticus, botulinus et tétanique, donc des microbes anaérobies et, de plus, tous hautement pathogènes. Cet

effet se produit au bout de 24 à 48 heures ; les spores ne sont pas touchées, ce qui confirme Gohar.

On a également étudié l'action du lysozyme envers *diverses espèces de virus* (Scheidegger, 1940)²⁶³ : vaccine, herpès, rage, influenza, encéphalomyélite du cheval, peste de la poule. Le lysozyme utilisé fut le blanc d'œuf : on fit des dilutions sériees de virus mélangées en parties égales avec du lysozyme non dilué. On maintint le tout pendant quelques heures dans un bain à 37° et on procéda à des essais sur l'animal.

Aucun des virus ne parut sensible, c'est-à-dire que le lysozyme n'exerça ni une action lysante ni une action inactivante.

Les conclusions à tirer de ces données semblent être les suivantes : le lysozyme est principalement et le plus fortement actif contre les germes aériens *saprophytes* (les G + d'après Kigasawa¹⁴⁵ ; cependant la sensibilité ne suit aucune règle précise). Vu la puissance considérable du lysozyme, il est peu probable qu'une transformation de bactéries saprophytes en pathogènes soit possible, de même celle de bactéries pathogènes pour l'animal, non pathogènes pour l'homme, en bactéries pathogènes pour l'organisme humain. Il faut encore relever qu'on obtient un certain degré de lyse pour le B abortus Bang et le pseudotuberculosis rodentium qui sont au point de vue caractères sérologiques identiques aux B melitensis et B pestis. Alors que les premiers sont des germes relativement peu dangereux pour l'homme, melitensis et pestis sont très pathogènes et il ne semble pas qu'il existe un lysozyme actif contre eux. Peut-être cette différence de sensibilité au lysozyme est-elle justement le caractère permettant de les différencier. Mais, d'autre part, ainsi que nous l'avons montré, les recherches modernes mettent en évidence une activité appréciable également pour toute une série de microorganismes *hautement pathogènes* pour l'homme. Ceci élargit donc singulièrement le champ d'action et l'importance du lysozyme comme moyens de défense du corps humain. Enfin, il est fort possible que beaucoup de bactéries actuellement non pathogènes pour l'homme, le sont à cause de leur sensibilité à l'action du lysozyme (The Lancet, 1941)¹⁶⁶.

*Cultures de souches lysozyme résistantes*⁹⁶. — On a vu qu'il existe beaucoup de bactéries sensibles au lysozyme, mais que l'une l'était spécialement : le M. lysodeicus ; de sorte que si l'onensemence un milieu contenant dans sa profondeur du lysozyme, il va se former une zone d'inhibition absolument stérile au-dessus de cette substance

et sur un pourtour variable. Si l'on prolonge cette expérience et qu'on laisse le milieu à l'étuve pendant 2 à 3 semaines, quelques petites colonies isolées vont *se développer* dans la zone auparavant absolument stérile. Examinées au plus près, elles se révèlent être des cocci ayant exactement les mêmes caractères morphologiques et culturels que le micrococcus lysodeicus.

On attribua ce comportement à certaines souches spécialement résistantes au lysozyme et l'on essaya de déterminer si des descendants de ces souches conservaient cette propriété. Soumis à l'action du lysozyme qui avait provoqué leur résistance et comparés à du *M. lysodeicus* normal, les cocci résistants furent dans chaque cas beaucoup moins touchés que les souches communes. Il y eut des différences de résistance mais jamais lyse complète. Il semble donc bien qu'il existe parmi les souches dites résistantes un nombre considérable de cocci absolument réfractaires à l'action du lysozyme. On en obtient encore une fois la preuve en ensemençant de cocci un milieu de gélose contenant du lysozyme homologue. Dans tous les cas, on obtient un nombre appréciable de colonies immédiatement au-dessus ou près du lysozyme, et dans le cas où la concentration en substance bactéricide est faible, une couche continue sur toute la surface recouvrant le lysozyme.

Fleming et Allison ⁹⁶ ont essayé de déterminer la résistance de ces couches envers des lysozymes de provenances différentes. Ils mirent successivement en présence d'une même souche des lysozymes de provenances les plus diverses. Après passage à l'étuve à 50° pendant une heure, ils constatèrent un effet semblable quel que fût le matériel utilisé. *Il n'y a aucunement spécificité.*

Une expérience assez démonstrative consiste à placer dans un milieu de minces bandes parallèles de lysozyme de diverses provenances et à ensemencher le tout. Après un séjour à l'étuve, on constatera une croissance égale sur toute la surface, si l'on a utilisé des microbes résistants ou des bandes d'inhibition avec des microbes sensibles. On peut conclure que le lysozyme doit être une substance à peu près semblable dans les divers tissus.

Des recherches ultérieures des mêmes auteurs ont montré que des souches rendues plus résistantes avaient également *une résistance accrue contre l'action bactéricide du sérum et contre la digestion intracellulaire* par les leucocytes; peut-être est-il permis de supposer que celle-ci s'effectue également par un genre de lysozyme.

MÉCANISME DE LA LYSE

Le mécanisme de l'action par le lysozyme peut revêtir plusieurs aspects différents :

1. *Action inhibitrice.* — Sur une plaque de gélose, on pratique une dépression en entonnoir, on y place un échantillon d'un quelconque matériel riche en lysozyme (larmes, mucus nasal, etc.). On le recouvre avec une goutte de gélose liquéfiée, à 60°, on attend que la solidification soit complète. On remplit alors complètement l'entonnoir avec de la gélose liquide qu'on laisse reposer, on recouvre enfin toute la plaque d'une couche régulière et fine. Onensemence régulièrement le tout avec du *M. lysodeicus*.

Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, on constate une culture abondante partout, sauf immédiatement au-dessus du lysozyme. La méthode utilisée exclut un déplacement du lysozyme vers la couche supérieure. Il s'agit donc bien de la pénétration d'une substance inhibitrice dans ou à travers la gélose. Ce fait explique l'inhibition qui se produit jusqu'à une distance d'environ 1 cm. Si l'expérience se poursuit pendant quelques jours, il y aura formation d'une zone plus ou moins transparente dans la région avoisinante de la zone d'inhibition. La substance inhibitrice a diffusé plus loin et provoqué la lyse des cocci qui s'y trouvaient.

C'est la démonstration de l'une des propriétés caractéristiques du lysozyme : *sa diffusibilité à travers la gélose.*

2. *Action bactéricide sans lyse.* — Un prélèvement de la région d'inhibition mis à l'étuve ne donne aucun résultat : il est absolument stérile, les microbes ont été tués. On a pu montrer de même que des prélèvements successifs à partir d'une suspension de *M. lysodeicus* de 1 million de germes par cm³, mis en contact avec du mucus nasal, dont la concentration était de 1/1000 (prélèvements exécutés après une durée de 1, 2, 5, 10 et 60 min.), se révèlent tous également stériles. Les cultures de contrôle à l'eau salée présentent toutes une abondante prolifération. Cette action bactéricide sans lyse s'exerce également sur d'autres bactéries *streptococcus faecalis*, par exemple.

3. *Action lysante.* — Phénomène perçu à l'œil nu : on met dans une éprouvette 1 cm³ d'une suspension de *micrococcus lysodeicus* suffisamment épaisse pour produire un trouble durable du liquide. L'adjonction d'une seule goutte de mucus nasal suffit à éclaircir en

quelques minutes cette solution. Plus le matériel sera riche en lysozyme, plus son action sera rapide.

Exemple : à 45° une dilution de lysozyme au 1/100 éclaircit une suspension de 1 cc. en 30 secondes ; placée dans de mêmes conditions, une dilution de blanc d'œuf au 1/5 éclaircit une suspension de 1 cc. en 10 secondes.

On peut également expérimenter sur un milieuensemencé de *M. lyso-deicus* en y déposant une goutte de lysozyme. En moins d'une min. à 37°, en 10 sec. à la température du laboratoire, on constatera une destruction complète avec formation d'un espace net et propre comme si les microorganismes auraient été enlevés par un moyen mécanique.

Phénomène perçu au microscope : utilisant du lysozyme de larmes, on remarque à l'ultramicroscope que les microorganismes perdent rapidement leur contour net, gonflent et disparaissent graduellement. En même temps, il y a apparition de petits grains (minute granula : Fleming)³⁷ ressemblant à ceux des leucocytes polynucléaires. En lumière directe, on les voit enfler et devenir transparents, en 2 minutes à la température du laboratoire. Après coloration par les méthodes habituelles, l'examen des cocci, en train d'être détruits, révèle des corpuscules de dimensions réduites ayant l'apparence de cocci petits et irréguliers. Lorsque la destruction est achevée, aucune méthode ne peut plus révéler quoi que ce soit. Ces faits ont été confirmés notamment par Nakamura²¹², Kigasawa¹⁴⁵, Bordet³⁶ et Ridley^{251, 252}.

Une caractéristique très importante du lysosyme est le fait que *son action s'exerce indifféremment sur les bactéries mortes comme sur les vivantes*. L'action lysante, d'après Gohar, est produite par des quantités légèrement supérieures de lysozyme à celles nécessaires pour l'action inhibante. L'ampleur relative des deux phénomènes est indépendante de l'espèce bactérienne en présence.

4. *Action floculante*. — Pour M. N. N. Klemparskaja (1939)¹⁴⁹, le lysozyme aurait la faculté non seulement de lyser mais encore de *floculer* les microorganismes. Ceux-ci (coli, staphylocoques, cocci et d'autres) pourraient être divisés en 3 groupes suivant l'effet du lysozyme :

1. Ceux qui ne se lysent pas mais floculent.
2. Ceux qui sont lysés et dans certaines conditions floculent.
3. Ceux qui résistent à la floculation et à la lyse.

Cette action floculante a fait l'objet de recherches par Friedberger et Hoder¹⁰⁰, elle se produit pour de nombreux microbes peu sensibles

à l'action lysante. Elle serait surtout perceptible avec le blanc d'œuf et ceci jusqu'à un très haut degré de dilution.

Elle se caractériserait par l'apparition de corpuscules bactériens comme dans le cas de l'agglutination. La plupart du temps, de gros flocons et des glaires muqueux se déposent au fond de l'éprouvette et s'y agglutinent : ils se composent de substances G⁻ parmi lesquelles on distingue :

1. Des bactéries agglutinées.
2. Des bactéries encore libres.

Ces substances une fois agglutinées ne peuvent être solubilisées que très difficilement ; on peut constater parfois un effet lytique partiel surajouté. La floculation n'est cependant jamais complète, le blanc d'œuf cuit ne possède plus ni faculté de floculer ni effet lytique. Les deux phénomènes sont affaiblis en présence de bactéries cuites. On note une *action optimale* pour les deux phénomènes en solution légèrement salée, une inhibition égale dans les solutions fortement salées de 5 à 8 %.

Les adsorbants retiennent les deux principes et on ne peut alors plus les séparer. Il semble qu'on se trouve en présence de deux variétés d'un seul phénomène. Cet effet floculant s'exercerait également contre des microbes pathogènes (*B. dysenteriae* surtout).

Il n'y aurait pas de rapport avec le phénomène habituel d'agglutination.

Cette floculation serait encore conditionnée par la valeur du pH et la concentration du lysozyme. La multiplicité des formes de comportement des microorganismes, en ce qui concerne la floculation par le lysozyme, s'expliquerait par la variété de leur structure colloïdale.

QUELQUES FACTEURS PARTICULIERS CONDITIONNANT SON ACTION

Il existe une *dilution optimale*, différente pour chacun des lysozymes suivant sa provenance, permettant d'obtenir une action maximale.

Un tableau composé d'après différents travaux de Fleming et Allison présentera la chose :

<i>Matériel :</i>	<i>D. M.</i>
Plasma citraté	1/80
Sérum défibriné	1/80
Sérum de caillots sanguins	1/40
Sérum sanguin.....	1/270
Larmes	1/40.000
Salive	1/300
Crachats	1/13.500
Mucus nasal	1/13.500
Synovie.....	1/80
Liquide pleural	1/81
Liquide d'ascite.....	1/50
Hydrocoel	1/18
Pus I	1/700
Pus II	1/100
Urine + pus + albumine .	1/32
Liquide de kyste ovarien ..	1/10
Liquide de kyste parotidien	1/100
Sperme (lyse partielle) ...	1/20
Foie	1/400
Amygdales	1/400
Reins.....	1/200
Intestins	1/500
Estomac	1/1000
Méninges	1/400 (ac.)
Peau	1/100 (ac.)
Cartilage	1/1300

D. M. = dilution maximale donnant une lyse complète en 1 heure à 45°.
Ac = lyse presque complète.

Par comparaison, les caractéristiques optimales du blanc d'œuf sont de 1/1000, ce qui donne une lyse complète en 2 minutes.

Le pH joue un rôle important. L'effet du lysozyme dépend étroitement de la réaction du milieu. Pour Fleming ⁸⁷, l'effet le plus rapide est obtenu avec moins de 1 % de NaCl., une solution de 5 % produit l'inhibition ; l'adjonction soit d'acide, soit de base, est susceptible de produire d'importantes modifications.

Ainsi, si l'on ajoute à une suspension de *M. lysodeicus* de 1 cc., une goutte de lysozyme + de l'acide chlorhydrique ou de la soude

caustique, on obtient : un retard avec une solution de 1/8000 N d'acide ou avec une solution de 1/24.000 N d'alcali. En 1929, il indique comme optimum une solution de 0,5 % de NaCl; il constate une inhibition marquée à 2 % et la suppression de l'effet à 5 %.

Pour Bordet (1929)³⁶, il y aurait une légère accélération par l'adjonction d'une solution de 1 % NaCl et inhibition dès 4 %. Une légère acidité serait ainsi favorable, l'alcalinité, par contre, arrête le phénomène.

Ceci est confirmé également par Andersen⁹. Examinant l'effet inhibiteur de NaCl, il estime qu'aux concentrations salées, élevées, le lysozyme ne se combinerait pas aux bactéries, mais ni l'un ni l'autre ne serait lésé. (Dès qu'on diminue la concentration, l'effet est rétabli.) Donc, l'effet de la concentration élevée est d'empêcher l'accès des bactéries au lysozyme.

Pour Suranyi²⁸⁰, l'effet est inhibé par l'acide dès que le pH = 5,7 est dans l'alcalinité dès que le pH = 7,2.

Enfin, pour Jelmoljeva et Bujanowskaya^{137, 138} le pH optimal est de 7,4.

Des mesures étendues ont été faites en 1938 par Boasson (Utrecht)³³ il chercha à déterminer quantitativement la lyse produite, par la mesure de l'absorption de la lumière, produite par une suspension de *M. lysodeicus*, à l'aide d'un extincromètre de Moll; cela lui permit de déterminer l'influence du pH, celle des électrolytes et de la teneur en lysozyme.

Pour lui, le pH le plus favorable est 6,2, c'est alors que la lyse est la plus visible. Dans les solutions acides cependant on se rend compte que le lysozyme agit bien au-dessus de ce pH, mais alors la lyse n'est optiquement plus perceptible. Dans l'eau distillée, il se produit un phénomène analogue; le lysozyme agit également bien en l'absence d'électrolytes; de même qu'en pH acide, mais il n'y a pas de lyse visible, les constituants bactériens étant insolubles.

Les concentrations élevées d'électrolytes empêchent l'adsorption de l'agent lysant aux bactéries, ce qui empêche la lyse; la *valence des ions* présente une certaine importance : plus elle est élevée plus son influence est grande sur le pH.

La membrane cellulaire ne serait pas détruite par un lysozyme mais deviendrait perméable. La réaction lysozyme-bactéries serait ainsi essentiellement *une réaction de surface*.

Un phénomène curieux, dépendant étroitement du pH, a été découvert et décrit par Nakamura²¹⁷. Dès sa publication, il a donné

lieu à de grosses discussions, mais toutes les recherches effectuées n'ont pu que confirmer ses vues.

Pour Fleming ⁸⁷, une acidité de 1/8000 - 1/2400 produit l'inhibition de l'effet lysozymique pour l'acide, pour l'alcalinité elle s'établit dès que la concentration de 1/800 est atteinte.

Pour Nakamura, une solution acide de 1/8000 produit une accélération du phénomène; entre 1/8000 et 1/1600 il n'observe pas de changement; d'après lui, l'inhibition ne commencerait que de 1/1600 - 1/200. En ce qui concerne l'alcali (NaOH) de 1/24.000 - 1/60, il y aurait toujours une certaine action, jamais d'inhibition complète.

Il situe la concentration lytique optimale en solution salée à 0,5 - 1 %.

Venons-en au phénomène lui-même :

Si l'on ajoute à un mélange formé de larmes et *M. lysodeicus*, inhibé par l'alcali, le réactif contraire : un acide, après neutralisation et surneutralisation, rien de particulier ne se produit.

Par contre, si à une solution semblable, inhibée par un acide on ajoute un alcali, jusqu'à neutralisation et surneutralisation, il se produit *un éclaircissement brusque* de la solution. Celui-ci est si rapide qu'il semble n'avoir rien de commun avec un processus biologique normal.

Si avec une solution inhibée par un acide à une concentration de 1/2000 - 1/1600, on fait un prélèvement avant l'adjonction de l'alcali, on constatera que les bactéries sont encore présentes. Il semble que l'action synergique de l'acide et du lysozyme provoque une différence d'état des microbes qui les rendrait très labiles et sensibles à l'action de la base. Si l'on extrait par centrifugation les bactéries, à partir d'une solution inhibée par un acide, qu'on les lave avec une solution de NaCl et qu'on les remet dans une solution physiologique, on constatera qu'un trouble persiste. Si l'on ajoute alors une base, les bactéries sont instantanément lysées.

Le phénomène ne se produit qu'en présence de lysozyme et d'un certain excès de base. On peut se demander si le phénomène de Nakamura et la lyse normale se développent parallèlement. Pour l'auteur, une adjonction trop forte de bactéries provoque un retard dans la lyse; peut-être les produits de lyse en sont-ils la cause, toujours est-il qu'elle finit par s'arrêter. Qu'on procède par fractions successives ou par une adjonction unique, le résultat est le même. Le phénomène de Nakamura est lié à la sensibilité au lysozyme; il n'est pas nécessaire qu'au moment de l'adjonction de l'alcali,

le lysozyme et l'acide soient encore présents dans la solution ; il suffit qu'ils aient eu suffisamment le temps d'agir auparavant. S'il est possible de faire un rapprochement avec la sérologie, on pourra dire que la base libre joue le rôle de *complément* ; elle n'a d'effet qu'après sensibilisation préalable des bactéries par l'acide et le lysozyme : *il faut l'action synergique des deux substances*.

Pour Kigasawa ¹⁴⁵, la base libre inhibe le lysozyme sans l'annihiler complètement en aucune concentration. L'acidité libre produit une inhibition dont les limites sont déterminées par le nombre des microbes en cause. La concentration du lysozyme ne semble pas jouer de rôle. Il confirme les expériences précédentes décrivant un épuisement progressif du lysozyme. Il ajoute que le phénomène de Nakamura ne se produit pas si l'on rend les microbes inattaquables, soit par chauffage de la solution de lysozyme, soit par l'emploi de souches résistantes.

Hallauer ¹¹⁸ rapporte que le lysozyme n'est pas inhibé par l'acide d'une concentration de 1/200 - 1/1600 et que cette inhibition par les acides ne repose pas sur une modification du lysozyme, mais bien sur le substrat bactérien attaqué. Les modifications des bactéries acidifiées, dues au lysozyme, sont caractéristiques ; elles résident dans *un fort gonflement de l'enveloppe* entourant la cellule.

Au moyen d'une technique histologique particulière, par des précipitations d'encre de Chine - bleu de méthylène, il réussit à mettre en évidence le contour cellulaire, ce que n'avait pas réussi Kigasawa avec la coloration de Gram. Une fois cette mise en évidence possible, il reste à en faire l'analyse chimique : *il s'agit d'une substance mucoïde*. Or, toutes les molécules de cette nature sont précipitées par l'acide et rediluées par la base, ce qui explique l'inhibition de la lyse ainsi que le trouble constaté.

Le lysozyme lui-même n'est donc pas touché, mais bien le substratum. Il ne pense pas que l'épuisement du lysozyme après plusieurs lyses, constaté par les auteurs ci-dessus, soit réel. Pour lui, il n'est qu'apparent, dû soit à des variations du milieu (pendant la lyse, en effet, la concentration en azote aminé augmente fortement en solution) soit, d'autre part, aux produits bactériens mis en solution ; il semble qu'il s'agit très simplement *d'un faux équilibre*, comme dans les processus fermentatifs.

Ajoutons que Fleming et Allison en 1922 déjà ⁹³ avaient établi ces propriétés :

Ils pensaient que cette *augmentation de la puissance lytique* dépend du nombre de microorganismes lysés ; elle semble spécifique au *M. lysodeicus*, quoiqu'il en existe d'autres chez lesquels ce phénomène existe également.

En 1929⁹¹, ils publient une table très suggestive à cet égard, reproduite ci-dessous.

A des quantités définies de larmes (dilution : 1/100), ils ajoutent successivement des quantités fixes de *M. lysodeicus* ; ils les placent à l'étuve à 50° pendant 15 minutes et obtiennent une lyse complète. Ils titrent alors la solution au point de vue de son pouvoir lytique comparativement à une solution de contrôle contenant des volumes identiques de larmes (dilution identique) sans contact avec les bactéries. On peut ainsi remarquer qu'après lyse d'une solution de 30.000.000 de germes par cm³, on obtient un pouvoir lytique 4 fois supérieur.

Cocci dissous	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000	1/80000	1/160000	1/320000
Contrôle ..	+	ac	±	0	0	0	0
0	+	ac	±	0	0	0	0
30 *	+	ac	±	Tr	0	0	0
300 *	+	+	ac	ac	+	0	0
3000 * ...	+	+	+	ac	±	0	0
30000 * ..	+	+	+	ac	±	Tr	0

* = million par cc. ; Tr = traces ; ac = lyse presque totale.

Table montrant l'augmentation du pouvoir lytique après lyse de quantités variables de M. lysodeicus.

Le fait que les bactéries lysées ne neutralisent pas l'agent lytique à un rapport étroit, sans aucun doute, avec l'activité du lysozyme contre les infections. Si l'on compare les antiseptiques chimiques aux naturels (placés dans des conditions identiques), on sera obligé d'admettre la grande supériorité de ceux-ci sur les chimiques, en expérimentant à conditions égales et favorables, bien entendu.

Notons encore que d'après Hallauer¹¹⁸, le lysozyme est détruit par les rayons ultra-violet ; or, remarque Andersen⁹, si l'on expose aux rayons U - V la solution acidifiée et qu'on rajoute un alcali, on obtient un phénomène positif.

Il faut donc en conclure que l'acidité n'a pas empêché l'action du lysozyme sur les bactéries ; l'irradiation a détruit le lysozyme encore libre, celui qui était déjà fixé aux bactéries, par contre, n'a pas été

touché, d'où la bactériolyse obtenue par adjonction de base. L'acidité croissante provoque donc une inhibition, puis une destruction partielle. L'action de la base est inséparable. Le lysozyme semble supporter plus difficilement l'action de la base que celle de l'acide. L'influence de la chaleur : il existe un optimum d'action à 60° (Fleming)⁸⁷ confirmé par Hallauer¹¹⁸.

Différents autres facteurs semblent encore jouer un rôle : ainsi pour Hallauer, il n'existe pas d'inhibition du lysozyme en milieu hydrocarboné (dextrine, maltose, saccharose, lévulose en solution à 1 %). La gélatine n'a également aucun effet (Suranyi, Gohar). Pour Andersen⁹, par contre, il y aurait une faible inhibition avec des mono et polysaccharides (dilution 1/20), l'urée et l'hexaméthylène tétramine n'ont aucun effet.

Hallauer¹¹⁸ étudia également l'effet des produits de dégradation des albumines sur le lysozyme. Des concentrations de peptones de 0,5 à 5 % amènent une activation de la lyse par rapport à la solution de contrôle (NaCl). Alors qu'en milieu NaCl, les cocci étaient lysés entièrement, jusqu'à une dilution de 1/10000 seulement, en milieu peptoné, on arrive à une lyse complète jusqu'à une dilution de 1/10.000.000.000.

Le glyocolle augmente et active la lyse. L'huile et la lécithine inhiberaient complètement le lysozyme, il y aurait une véritable liaison, très stable avec la lécithine (Wolff)³⁰⁷.

Le chloroforme, l'éther, le toluol, le xylol, l'alcool et l'acétone n'ont aucune influence sur la puissance lytique du lysozyme (Fleming et Allison^{87, 93}).

KI, KClO₃, le citrate de sodium ont une action identique à celle de NaCl déjà cité.

Les sels de métaux lourds comme le sulfate de cuivre produisent une inhibition totale ; jusqu'à une dilution de 1/32 ‰ et même de 1/64 ‰, on obtient encore un effet (Andersen).

QUALITÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Solubilité. — Le lysozyme est soluble dans l'eau ou la solution N salée ; insoluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, le toluol, le xylol et l'acétone. Ces faits décrits par Fleming et Allison ont été confirmés par tous les auteurs. Le lysozyme ne se dissout pas dans les

graisses et les lipoides, mais est absorbé par ces substances, de sorte qu'on ne peut le ramener en solution aqueuse qu'extrêmement difficilement (Wolff)³⁰⁷. Il serait soluble dans les graisses et les lipoides.

Précipitation. — D'après Fleming et Allison^{87, 93}, il précipite en solution albumineuse par les agents précipitants habituels des albumines, tels que alcool, acétone ou acide picrique ; il précipite alors en même temps que les protéines.

Action de la température. — Les auteurs divergent passablement, du fait que le comportement du lysozyme envers les hautes températures dépend de la forme sous laquelle il est en solution. Ainsi une adjonction d'acide provoque une coagulation tellement intense des albumines que le lysozyme en est protégé et supporte une cuisson de 15 minutes sans être modifié. (Hallauer, Bordet et Nakamura)^{118, 36, 217}.

Une température au-dessus de 60° lui est cependant néfaste. Tous sont d'accord cependant pour affirmer que le lysozyme supporte facilement une élévation passagère notablement supérieure à 56°, température qui est critique pour de nombreuses substances bactéricides ou inhibantes.

Fleming⁸⁷ chauffa de l'extrait de crachat, de mucus nasal, de salive, de tissus, de panicule adipeux pendant 10 minutes à 60°. Le lysozyme garda à peu près toutes ses qualités ; si on le porte pendant 5 minutes à 75°, il est presque entièrement détruit (larmes) ; dilué au 1/500 dans une solution salée N., la concentration du lysozyme fut réduite à 1/3 après 10 minutes de chauffage à 75°. Après une cuisson de 30 minutes à 100°, on n'en retrouve que des traces ; après une heure de chauffage le lysozyme est entièrement détruit.

Pour Wolff³⁰⁶, le lysozyme est rendu inactif dans les humeurs du corps humain à 70° déjà en 7 1/2 minutes. Dans les solutions dont le taux en lysozyme est faible, malgré une cuisson à 100° pendant une heure, l'effet resta faible.

Pour Fleming et Allison, la ptyaline et le lysozyme disparaissent en même temps de la salive au cours de la cuisson. Des températures basses ralentissent l'effet de la lyse mais ne détruisent pas ses qualités (Fleming et Allison⁹³).

Adsorption. — Le lysozyme est extrêmement bien adsorbé par toute une série de substances. Fleming et Allison ont étudié le charbon : mélangeant à une solution de larmes (dilution de 1/1000) une petite

quantité de charbon, ils laissent reposer ce mélange pendant 2 heures. Après centrifugation, le liquide ne contient plus aucune trace de lysozyme, une goutte de liquide frais rajouté à la solution rétablit le pouvoir lytique. Ils expérimentent de même pour le coton : dans une éprouvette, ils versent du liquide buccal frais, puis placent au-dessus un tempon de ouate ; ils le poussent fortement vers le fond, de façon à faire passer tout le liquide au travers : *le liquide surnageant se révèle privé de son lysozyme.*

On peut prouver aussi l'adsorption du lysozyme par des filtres de papier, de porcelaine, de celluloid, l'acide silicique et d'autres colloïdes électronégatifs ; cela permet de supposer qu'il est lui-même *un colloïde électropositif* (Wolff)³⁰⁷, des expériences de cataphorèse permettent également de supposer la chose (Jelmoljeva et Bujanowskaja)¹³⁷.

Wolff³⁰⁶ a réuni ces résultats d'expériences montrant le degré d'adsorption de divers absorbants, d'après la chute de concentration en lysozyme après passage à travers ces substances.

Lysozyme 1/10.000

1 cm ³	10 mgr. Norit.....	1/10
1 »	10 mgr. terre d'infusoires	1/1000
1 »	100 mgr. kaolin	1/10 ?
1 »	hydroxyde d'Al sec	1/10.000
1 »	hydroxyde d'Al mouillé	1/10.000
1 »	acide silicique sec	1/500
1 »	acide silicique mouillé	1/50
1 »	fibre de papier	1/20

Il est extrêmement difficile de séparer l'adsorbé de l'adsorbant, la plupart du temps c'est impossible : dans les cas de la Norit, on ne retire que le 1/100 de la solution adsorbée (Wolff)^{307, 306}.

Filtration. — Le lysozyme n'est pas capable de traverser *la membrane de collodion* (Fleming)²⁷, *ni celle de parchemin* (Ridley)²⁵². Il est cependant filtrable mais pas de la manière usuelle. Le filtre doit d'abord être saturé par une certaine quantité de lysozyme, qui est retenu par adsorption, alors seulement le pouvoir lytique réapparaît.

Les expériences ont été faites avec du lysozyme de blanc d'œuf, on utilisa une solution à 1/10 en solution physiologique. Chaque

cc. du filtrat fut recueilli séparément et étudié au point de vue lytique. Les 19 premiers cc. ne contenaient aucune trace de lysozyme ; dès le 20^e il réapparut peu à peu, au 30^e il était rétabli dans son intégrité. Cette expérience montre qu'une quantité considérable est retenue par le filtre ; puis une fois celui-ci saturé, le lysozyme passe sans aucune difficulté.

C'est un argument en faveur de l'hypothèse énoncée plus haut : il semble bien qu'on ait affaire à un *colloïde électropositif* ; on obtient également le même résultat avec le filtre de papier ou de coton (12 cc. d'une solution de salive à 1/1000 sont nécessaires).

Nakamura ²¹⁷, par contre, rapporte une filtration obtenue sans difficulté aucune avec le filtre de porcelaine et la bougie de Berkefeld. Bordet ³⁶, également, n'a eu aucune perte de substance après la filtration au moyen de la bougie de Chamberland n^o 5.

Il ne serait pas dialysable (Jelmoljewa et Bujanowskaja) ¹³⁷.

Diffusion et conservation. — Il diffuse à travers la gélose.

Le lysozyme peut-il être conservé ? A la température du laboratoire, le matériel contenant du lysozyme ne perd rien de ses qualités lytiques (Fleming et Allison) ⁹³.

Andersen ⁹ a pu conserver du blanc d'œuf pendant trois mois, il était parfaitement stérile ; contenu dans un récipient fermé à température du laboratoire, le titrage du lysozyme montra une concentration absolument normale, ce qui fut confirmé par Suranyi ²⁸⁰.

Kigasawa ¹⁴⁵ rapporte, par contre, qu'il n'utilisa jamais le même matériel (blanc d'œuf) au delà d'une semaine, à défaut de quoi l'effet lytique paraissait quelque peu diminué, surtout en solution salée.

Dessication. — Le lysozyme est extrêmement résistant à la dessication. Fleming rapporte avoir constaté la présence de lysozyme dans du blanc d'œuf du commerce, vieux de plusieurs mois et même de plusieurs années. Allison, Ridley et Bordet ont fait des constatations semblables ^{93, 94, 251, 36}.

Andersen ⁹ conserva du blanc d'œuf pendant 2 ans après dessication, la détermination de la teneur en lysozyme donna 1/100.000 (à l'état frais 1/1.000.000).

Effet de la lumière. — Du Dcheng Hsing ⁷⁴ exposa du blanc d'œuf frais à la lumière solaire pendant 6 heures, le pouvoir lytique fut pleinement conservé ; Wendling ³⁰² rapporte une expérience semblable, poursuivie pendant 24 heures avec un résultat identique.

Sa destruction. — Le lysozyme est détruit :

1. Par un chauffage de 15 minutes à 100° ou exposé à des températures inférieures pendant une durée plus longue (par exemple : à 70° pendant 7 ½ heures : Wolff - 9 heures : Wendling).

2. Thymol (Fleming et Wolff) ^{306, 307}.

3. Glycérine (Wolff) ^{307, 306}.

4. Cuivre (Andersen) ⁹.

5. Rayons ultra-violets (Hallauer) ¹¹⁸ : leur action dépendrait de la concentration et de la dispersion du blanc d'œuf (Pincussen) ²³². Il est d'autant plus rapidement détruit qu'il est plus dilué et d'autant plus lentement touché que la concentration en albumine est plus grande. Rappelons que l'on a des relations identiques pour les *anticorps* (Doerr et Moldovan, Friedberger, Schubert et d'autres), le *complément* (Abelin et Stiner, Braun) ^{1, 40}, les *toxines* (Cernovodeanu Nogier).

Action des substances désinfectantes, olygodynamiques et de ferments. — Cette action a été particulièrement étudiée par Allison ⁹¹ en faisant des dilutions sériées de l'antiseptique dans les solutions salées avec adjonction de volumes connus de lysozyme et de M. lyso-deicus avec tubes contrôle.

Voici ces résultats :

<i>Antiseptiques</i>	<i>Effet lytique des larmes</i>	<i>Concentration inhibant la croissance des staphylo- coques dans le sang</i>
Eusol.....	1/128	1/2
Chloramine T ...	1/32.000	1/320
Iode.....	1/64.000	1/400
Acide phénique ..	1/80	1/320
Flavine	1/30.000	1/30.000

On remarque que spécialement avec le groupe des antiseptiques halogénés, l'élément antibactérien des larmes (également le lysozyme d'autres provenances) est plus sensible à l'antiseptique qu'un microorganisme pathogène aussi commun que le staphylocoque. On peut affirmer cependant que le lysozyme est extrêmement résistant aux influences les plus diverses. Les désinfectants habituels comme l'acide phénique, la formoline, le sublimé et l'alcool (si l'on admet encore qu'il est antiseptique), aux concentrations habituelles, ne lui sont pas défavorables. Ce n'est qu'à une concentration relativement élevée qu'ils se révèlent capables d'inhiber mais non pas

de détruire son action (Nakamura, Suranyi, Gohar, Andersen, Kimura) ^{217, 230, 109, 9, 145}.

Hallauer ¹¹⁸ essaya l'action olygodynamique de l'argent en le plaçant dans des solutions de dilutions diverses (larmes). 12 heures après, il enlève cette substance et y rajoute du M. lysodeicus. La lyse fut instantanée pour toutes les dilutions.

Andersen signale un résultat identique ; il étudia ⁹ aussi le selenium et obtint un résultat négatif. Par contre, l'action des lames de cuivre se révéla fortement positive ; elle détruisit le lysozyme (blanc d'œuf) en 8 jours.

L'effet du lysozyme n'est pas diminué par l'effet de ferments tels que trypsine et pepsine (Fleming, Allison, Ridley, Wolff, Hallauer, pancréatine et diastases [Jelmoljewa, Bujanowskaja]) ^{93, 251, 252, 118, 137}.

PROPRIÉTÉS ANTIGÉNIQUES

Par son effet bactéricide rapide, et son action élective sur certains microorganismes, il semble exister des rapports d'identité avec l'alexine, mais le lysozyme représente certainement un mécanisme aussi curieux qu'indépendant. Il semble jouer un rôle de *sensibilisatrice* de haute qualité, sans intervenir directement sur les microorganismes, les bactéries étant sensibles à des variations très faibles de pH. La lyse ne semble donc pas être le fruit de son action directe, il ne fait peut-être que la préparer (Kigasawa).

Plusieurs auteurs se sont occupés de déterminer une antigénité possible. Des études systématiques furent faites par Allison et Douglas ^{4, 5}. Ils ne remarquent aucune augmentation du pouvoir lytique du lysozyme après vaccination, soit avec des cultures de M. lysodeicus chez le lapin, ou de streptocoques faecalis (10 à 20 millions de germes) chez l'homme.

Au cours de recherches postérieures, Allison démontra qu'une injection de bactéries lysées par le lysozyme amène une *augmentation* de l'effet bactéricide du sérum, par formation d'*anticorps spécifiques* fixant le complément (chez le lapin). L'effet opsonique augmente, alors que les quantités de bactériolysines, précipitines et agglutinines ne sont pas modifiées. Ces résultats correspondent à ceux de Douglas, effectués avec des bactéries extraites par l'acétone et digérées par la trypsine. Des bactéries lysées par le lysozyme reagissent,

au test de la précipitine, comme un antigène beaucoup plus sensible que les autolysats en solution salée ou les centrifugats de cultures sur bouillon vieilles de deux jours.

Hoder¹³⁰ fit également de nombreux essais pour déterminer si le lysozyme agit comme opsonine. Il utilise les concentrations limites actives de lysozyme et les mélange, à parties égales, avec des globules rouges (lavés trois fois) et du sérum, + une solution de *M. lysodeicus* et détermine l'index opsonique par rapport au même sang sans apport de lymphé. Tous les nombreux essais effectués ont donné des résultats identiques. L'index opsonique se trouve toujours autour de 1. Pour lui, *le lysozyme n'agit pas comme opsonine*.

Kigasawa¹⁴⁴ procède par injections intraveineuses diluées d'abord, sous-cutanées et concentrées ensuite chez le lapin, de façon à obtenir un sérum contenant des antigènes. Ces sérums ont une action fortement précipitante pour le blanc d'œuf ; bien qu'on ne puisse admettre que le lysozyme soit une substance albumineuse, on pourrait penser qu'il est lié à une protéine.

En concentration diluée, l'effet précipitant disparaît et l'effet lysozymique s'exerce librement. D'autre part, on peut précipiter les albumines du blanc d'œuf par une goutte de sérum ; si l'on rajoute du *M. lysodeicus* et du lysozyme, on obtient alors une lyse complète et immédiate.

L'analyse des extraits retirés par centrifugation et lavés ne montre aucune trace de lysozyme ni d'antilysozyme. On essaya également l'action du sérum anti-blanc d'œuf sur du lysozyme provenant d'autres organes : on obtint soit des résultats contradictoires, soit aucun effet, soit encore une action renforcée.

Bien qu'on ne puisse tirer une conclusion certaine de ces essais exécutés avec des albumines étrangères (poule, lapin), on pourrait admettre qu'il n'y a pas production d'antilysozyme, qu'il n'y a pas de propriétés antigéniques, comme le supposait Fleming. D'après lui, le lysozyme relèverait bien plutôt de l'immunité naturelle.

Cependant de nouvelles recherches vont prouver que *cette anti-génité* est bien réelle.

Jelmoljeva et Bujanowskaja en 1931¹³⁸ estiment que le lysozyme est un antigène puissant, capable de produire des antisérums avec des concentrations élevées de précipitines et jouissant de propriétés antilysozymes étendues. Il ne serait actif qu'à des concentrations élevées et ne donnerait pas de réaction de précipitation ou d'agglutination. (Ils ne donnent pas de détails de leur technique.)

En 1937, Melnik et Tcherviakov¹⁸⁷, rapportent des expériences concluantes concernant la préparation de vaccins avec des bactéries tuées par le lysozyme, expériences faites sur l'homme également (cf. applications pratiques).

Il semble que si les résultats sont jusqu'ici aussi contradictoires, c'est que tous ces auteurs ont utilisé du lysozyme brut. Les expériences faites avec la substance pure présentent un caractère très constant et sûr.

Roberts²⁵⁵ en 1937 vérifie ces expériences et confirme les propriétés antilysozymiques ; il constate une réaction à la précipitine très nette.

Utilisant 6 lapins, il fait à chacun une série de 6 injections intrapéritonéales (la première de 2 cc., les autres de 3 cc. à des intervalles de 4 jours ; la solution de lysozyme était de 0,5 %).

Dix jours après la dernière injection, les animaux furent saignés. Tous les quatre donnèrent une réaction positive au test de la précipitine. Chaque sérum fut alors dilué avec 5 volumes de solution physiologique et mélangé avec la solution primitive de lysozyme en dilution progressive : tous montrèrent une précipitation, le sérum normal aucune.

Il apparaît que dès que l'antisérum est en excès, l'activité du lysozyme disparaît. On peut ainsi conclure que *le lysozyme peut fonctionner comme antigène*.

C'est *une enzyme* de plus, capable de cet effet, chose assez étonnante du fait de la richesse des tissus et des sécrétions en lysozyme. Cela ne doit pas nous surprendre, car une observation identique a été faite par Northrop (1929-1930)²²⁰ concernant la pepsine.

Il faut remarquer que le lysozyme utilisé ne provient pas des animaux utilisés pour l'expérience, d'où l'hypothèse que le lysozyme n'est probablement pas aussi indépendant de son origine qu'on a bien voulu le supposer ; Fleming dans sa communication de 1932 le suggère également.

Cette idée s'est révélée exacte. En 1938, Roberts, Margraith et Florey²⁵⁵ ont établi la chose en faisant une étude comparative des lysozymes du blanc d'œuf et de la salive du chat et de l'homme.

Au moyen d'un sérum antilysozyme obtenu par injections intraveineuses de lysozyme de blanc d'œuf, ils ont réussi à créer un sérum précipitant le lysozyme avec une dilution de l'antigène de 1/1.000.000. Ce résultat est le plus élevé obtenu jusqu'ici pour un sérum anti-enzyme, puisqu'il dépasse même celui obtenu par Sumner²⁷⁹ avec un sérum antiurée. Il s'obtient indifféremment avec du sérum non

dilué ou dilué avec 5 volumes de solution physiologique. Les 3 substances étudiées ont des réactions sérologiques différentes. Les réactions de précipitation et d'absorption indiquent qu'elles sont *de natures différentes*.

L'antigène immunisateur spécifique du lysozyme du blanc d'œuf manque dans le lysozyme de la salive du chat et de l'homme. Il est probable que s'il était possible de préparer des sérums avec du lysozyme de chat ou de l'homme, on puisse démontrer la présence d'un *antigène spécifique de groupe*. Les résultats des réactions de précipitation pour la salive de chat et celle de l'homme se recouvrent en effet assez bien.

Ces résultats ont été confirmés par le fait que l'activité antilysozyme du sérum anti-blanc d'œuf ne touche que son antigène spécifique apparenté.

Les auteurs ont finalement essayé l'immunisation de rats avec du lysozyme de chat. Ils obtiennent un sérum qui précipite l'antigène spécifique déjà à une dilution de 1/1000, mais qui est inactif contre le lysozyme humain ou de blanc d'œuf. L'injection du lysozyme humain au rat ne donne pas de résultat.

EXTRACTION DE LA SUBSTANCE PURE

Elle a été tentée dès 1927 par L.-K. Wolff. Voici comment il procède ³⁰⁷ :

Le liquide à examiner est dilué avec du bouillon neutre, la solution la meilleure est celle qui est tamponnée et dont le pH est neutre. On ajoute ainsi à toutes les solutions obtenues une quantité égale de *M. lysodeicus* en suspension dans le bouillon. On choisit cette quantité de façon à ce que le mélange soit nettement trouble.

Généralités. — On n'emploie que des récipients strictement stériles. D'autre part, il ne faut jamais filtrer avec du papier à cause de l'adsorption. De plus, l'ultra-filtration ne donne aucun résultat pour l'isolement du lysozyme du blanc d'œuf. Si l'on cherche à le précipiter par l'acide sulfosalicylique ou trichloracétique, il est entraîné dans la précipitation. On ne réussit pas mieux par la précipitation avec de l'alcool ou l'acétone. Avec l'hydroxyde ferrique colloïdal, par contre, il est impossible d'obtenir une scission par laquelle le lysozyme reste intégralement en solution.

On peut encore le purifier par trois méthodes :

1. En le concentrant par évaporation à basse température.
2. Par dialyse.
3. Par précipitations répétées au moyen d'acétone.

Méthode proprement dite :

1000 cc. de blanc d'œuf, obtenus à partir d'œufs très frais, sont filtrés à travers un tamis métallique très fin.

On solubilise le liquide obtenu avec 90 volumes de solution de NaCl à 0,9 % et on mélange avec 4000 cc. d'une solution d'hydroxyde ferrique colloïdal (solution à 5 % d'oxyde ferrique en lamelles dialysées). On centrifuge, puis on évapore à basse température ; le liquide est alors dialysé pendant quelques jours à l'aide d'une membrane de parchemin, le 2^e milieu étant l'eau courante.

On évapore à nouveau jusqu'à obtention d'un volume très réduit ; il faut bien prendre soin de ne jamais dépasser une température de 40°. Puis on le traite avec 9 fois son volume, d'acétone. On obtient ainsi une précipitation, laquelle, après centrifugation et légère dessiccation, est dissoute dans un petit volume d'eau. On traite une nouvelle fois avec une faible quantité d'hydroxyde ferrique de façon à obtenir une solution claire à la centrifugation et qui ne se trouble plus à la cuisson.

Le liquide est enfin dialysé une dernière fois (le 2^e milieu étant l'eau distillée). On précipite avec de l'acétone, on sépare le précipitat par centrifugation, on le dissout dans l'eau distillée. On centrifuge ensuite jusqu'à obtention d'un liquide clair et l'on évapore dans le vide en présence de H₂SO₄. On obtient ainsi une substance amorphe, légèrement jaunâtre, faiblement soluble dans l'eau. Dissous dans un litre d'eau, il lyse le M. lysodeicus aussi bien que le lysozyme du blanc d'œuf frais utilisé pour cette préparation.

Pour un litre de blanc d'œuf, on obtient 100 mgr. de substance purifiée ; celle-ci ne donne plus aucune réaction positive au test de l'albumine. La solution reste claire à la cuisson, additionnée de NaCl ou d'acide acétique également.

Elle n'est pas précipitée par la solution saturée de NH₄ ou MgSO₄.

L'adjonction de HNO₃ ne produit ni couleur jaune, ni précipité, celle de ferricyanure de potassium + sulfate de cuivre + soude caustique révèle quelques traces de coloration.

Le lysozyme ainsi obtenu ne contient ni N ni P ni S. Il ne traverse pas le parchemin par dialyse, il est peu sensible aux agents chimiques, il est détruit par la cuisson.

Il possède toutes les qualités d'un colloïde.

L'unité lysozyme est la quantité de lysozyme contenue dans un cm³ de blanc d'œuf frais.

En général de bonnes préparations donnent 0,1 mgr. par cm³ de blanc d'œuf. Mais la teneur varie considérablement avec les échantillons. Wolff en donne deux exemples : pour l'un il obtient $1 \mu = 0,625$ mgr. et pour l'autre $1 \mu = 0,340$ mgr.

On pourrait d'ailleurs procéder à une dernière purification, ce qui modifierait encore ces données :

Si l'on utilise un échantillon très riche, $1 \text{ cm}^3 = 50 \text{ à } 100 \mu$, et qu'on le précipite par l'hydroxyde ferrique, qu'on le centrifuge et qu'on le dialyse avec de l'eau distillée, l'on pourra obtenir une valeur de 0,1 mgr. par cm³. C'est dire le peu de précision des valeurs ainsi obtenues.

Ordre de grandeur du lysozyme : on peut éclaircir une suspension de 1 cc. de M. lysodeicus en ajoutant du blanc d'œuf dilué à 1/80, ce qui donne :

$$1/250 \times 1/80 = 1/200.000.000 = 1/2 \times 10^{-12}$$

Cette quantité a un poids égal à peu près à celui du BK ($0,3 \times 10^{-12}$). Il n'y a que le bactériophage dont on puisse prouver la présence pour une quantité encore inférieure de 1/1.000.000, mais pour celui-ci comme pour le BK, uniquement après leur multiplication, ce qui n'est pas le cas pour le lysozyme.

Méthode de Bordet :

Pour lui on peut porter le blanc d'œuf à 100° après acidification sans dommage aucun. Sa méthode est basée sur cette constatation.

A 10 cc. de blanc d'œuf dilué au 1/5^e on ajoute 0,5 cc. d'acide citrique ou acétique à 10 %. Après 15 minutes d'ébullition, le blanc d'œuf est coagulé ; il présente des fragments blancs, poreux et élastiques surnageant dans un liquide absolument limpide.

On neutralise alors avec du carbonate calcique et l'on agite de façon à ce que le coagulum soit bien pénétré. Après centrifugation, on constate que le liquide limpide surnageant lyse aussi bien que le blanc d'œuf dont on s'est servi pour l'expérience. Dans cette opération, le blanc d'œuf doit être dilué au 1/3 au moins.

Le lait humain la salive de chien, conservent leur activité à l'ébullition, en milieu acidifié à 1/5000. Le pouvoir lytique ne

se manifeste qu'après neutralisation. Avec l'extrait de blanc d'œuf obtenu ci-dessus, l'alcool donne un précipité, lequel, desséché et repris avec de l'eau distillée, fournit un liquide à propriétés lytiques. En faisant la précipitation dans un liquide acidulé à 2 ‰, on obtient un extrait insensible à l'ébullition et à la dessiccation.

Méthode de Bujanowskaja :

J. S. Bujanowskaja ⁴² en 1930 a confirmé les deux procédés décrits ci-dessus ; elle n'estime cependant pas qu'ils soient entièrement satisfaisants et en propose un autre : *la cataphorèse*. Elle pense en effet que le lysozyme qu'elle a obtenu par cuisson du blanc d'œuf avec de l'acide citrique et précipitation par l'alcool après neutralisation, contient de l'ovomucoïde ; il donne une réaction xanthoprotéique positive et contient de l'azote et du phosphore. Le lysozyme des larmes, par contre, ne donnerait pas de réaction positive à l'albumine et ne contiendrait que de l'azote non albumineux (amino N).

Par la cataphorèse, l'auteur obtient du lysozyme concentré (purifié) ; voilà comment elle procède :

On fait passer un courant de 5 milliampères pendant 12 heures à travers un tube contenant de la gélose, sur laquelle se trouve le lysozyme. Celui-ci, étant électropositif, va se déposer au pôle négatif et s'accumulera dans la gélose.

On sort cette gélose de l'appareil, on la lave plusieurs fois à l'eau et on extrait le lysozyme avec une solution de 0,5 % de NaCl. L'extrait des différentes couches de gélose se caractérise par une activité accrue (effet lytique à une dilution de 1/7.000.000 au lieu de 1/1.000.000), par une teneur très faible en amino N. On a ainsi la possibilité d'obtenir du lysozyme concentré sans albumine.

En 1935 paraissait un travail de Meyer, Thompson, Palmer et Khorazo ²⁰⁶. On peut alors dire que les méthodes de préparation entrent dans leur phase de mise au point définitive. Il ne s'agit plus de tâtonnements, on cherche à appliquer les techniques classiques utilisées pour la purification des ferments en général telles que la précipitation par l'alcool ou le mélange d'éther-alcool et dessiccation dans le vide, ou encore l'usage de l'acétone (Willstätter). La précipitation suivie d'élution est également une méthode générale bien connue, de même que la dialyse et la filtration.

On s'efforce de suivre les données établies par Willstätter en contrôlant dans chaque phase :

a) La qualité obtenue par rapport au matériel initial.

b) La concentration du ferment dans les préparations obtenues, c'est-à-dire son degré de pureté (*cf.* Schaeffer : les ferments, Masson, 1929, Paris).

Meyer et ses collaborateurs obtiennent leur matériel de départ par la précipitation de blanc d'œuf naturel par 90 volumes d'acétone glacial. Après avoir laissé reposer le mélange au froid pendant une nuit, le précipité est filtré, lavé avec de l'acétone et de l'éther, et séché dans un dessiccateur à vide, chauffé, en présence de P_2O_5 . Ordinairement, on retire environ 14 à 15 % du poids total du blanc d'œuf initial, sous forme d'une poudre sèche, jouissant d'un effet lytique entièrement conservé. La précipitation par l'acétone au pH alcalin normal du blanc d'œuf rend insoluble la plus grande partie des protéines, alors que le lysozyme reste soluble en milieu aqueux. sont extrêmement élevées : un procédé nouveau s'imposait donc.

Les auteurs estiment que le procédé de Wolff a des inconvénients majeurs; en effet, l'adsorption au fer colloïdal est si grande que les pertes sont énormes : un nouveau procédé s'imposait donc.

Leur procédé :

Dans la méthode adoptée finalement, des quantités successives de 10 gr. de blanc d'œuf étaient soumises à l'action d'un mélange de 200 cc. d'alcool à 50 % + 10 % d'acide acétique, à une température de 60 à 70° pendant 20 à 30 minutes. Ce procédé s'est révélé absolument inoffensif pour l'enzyme.

Ce mélange refroidi était filtré et le filtrat évaporé sous faible pression jusqu'à obtention d'un volume réduit. Celui-ci est alors repris avec de l'eau et précipité avec 5 volumes d'alcool. Le mélange est remis au froid pendant la nuit, le précipité prélevé, lavé à l'alcool, repris dans 100 cc. d'eau légèrement salée et acidifiée par H_2SO_4 pour obtenir une précipitation maximale.

Le lysozyme est précipité du liquide surnageant par de l'acide flavianique. Le mélange est remis au froid pendant 24 à 48 heures et le précipité jaune centrifugé, séparé et lavé avec de l'alcool jusqu'à disparition de la couleur jaune. Le flavianate est dissous en quelques instants dans de l'eau légèrement alcaline par NaOH (coloration légèrement rose à la phénolptaléine), ensuite précipité par H_2SO_4 dilué en présence de traces d'acide flavianique.

La teinture est extraite à partir du précipité humecté à l'alcool, par actions successives de portions de 200 cc. d'alcool glacial à 90 % contenant 0,5 % d'ammoniaque. Rappelons que c'est la méthode

utilisée avec succès pour la purification des hormones hypophysaires : c'est à cette occasion que fut mise au point la technique de l'extraction par l'ammoniaque alcoolisée. Cet ammoniaque est séparé à son tour du précipité par des lavages d'alcool-éther et séché.

Le rendement obtenu est de 100 à 150 mgr. pour 10 gr. de poudre de blanc d'œuf utilisé, l'activité de 2000 à 6000 μ par mgr.

On peut concentrer davantage encore par l'action de petites quantités d'eau acidulée avec de l'acide acétique, suivie soit d'une précipitation par l'acide flavianique ou picrolonique, soit d'évaporation dans un vide élevé en présence de P_2O_5 (à l'état congelé).

Le flavianate ou le picrolonate peut être à son tour purifié par recristallisation à partir de pyridines aqueuses à 50 %.

Par cette méthode, des préparations d'apparence cristalline ont été obtenues dont la puissance était de 32.000 μ par mgr.

Les auteurs n'ont pas pu établir une méthode standard de cristallisation.

La principale impureté des diverses préparations de lysozyme ainsi obtenues était un mucoïde provenant de l'œuf ; celui-ci n'était pas précipité par l'acide flavianique et pouvait facilement être extrait par précipitation alcoolique dans la solution surnageante d'acide flavianique. Un tel précipité contenait environ 11 % d'azote et 25 % de sucre réducteur après hydrolyse et ne présentait absolument aucune activité lysozymique.

Les préparations les plus pures obtenues par cette méthode étaient basiques, solubles en milieu aqueux acidifié et insolubles dans les solvants organiques purs.

Ceci explique les contradictions rencontrées lors de la filtration par la bougie de Berkefeld :

- a) En milieu alcalin : il n'y a pas de filtration.
- b) En milieu acidifié (acide acétique) : filtration partielle.
- c) En milieu acidifié par un acide dilué minéral : filtration totale.

Elle contiendrait environ 15 % d'azote, une petite quantité de soufre (sulfhydryle) et du phosphore.

Une préparation nettement cristalline au microscope polarisé avait la composition suivante :

C = 48,65 % H = 6,44 % N = 15,33 % cendres = 3,31 %
P = 0,25 % S = 0,64 %.

Le poids moléculaire doit être d'environ 25.000.

Vers 1930, le professeur Florey, sur la base de quelques recherches personnelles, indépendamment des auteurs précédents, émit l'opinion

que le lysozyme pourrait bien remplir une fonction différente de celle décrite jusqu'ici (son action bactéricide). Celle-ci ne serait qu'accessoire, le rôle principal étant une intervention physiologique dans les processus d'oxydation cellulaire.

En effet, vu sa répartition apparemment fantaisiste, son action en majeure partie sur des bactéries non pathogènes, il lui semblait difficile d'admettre un rôle principal dans l'immunité naturelle, telle que l'avait définie Fleming^{97, 254}. Pour lui, l'essentiel était de connaître sa nature chimique exacte et celle de son substrat.

D'où une nouvelle série de recherches entreprises dès 1931 en collaboration avec M. Stephenson, puis avec Harrison, en 1934-1935, et depuis lors par Roberts.

Ces auteurs obtiennent des résultats intéressants, *ils combinent les deux méthodes de Wolf et de Bordet* ; ils acidifient d'après Bordet, puis déprotéinisent avec le fer colloïdal et finalement précipitent par l'acétone ; en répétant ce procédé, ils arrivent à réduire le taux d'azote jusqu'à 8,77 % et augmentent parallèlement l'effet utile par mgr.

C'est alors qu'ils sont devancés par la première publication de Meyer^{206, 208, 209} et de ses collaborateurs, utilisant la précipitation par l'acide flavianique. Cette méthode leur parut cependant difficile dans ses derniers stades et délicate à utiliser ; ils s'efforcèrent donc de la simplifier.

Méthode de Roberts :

Le matériel de base était la même poudre blanche obtenue par précipitation par l'acétone comme chez Meyer. Ce procédé réussit aussi bien à 0° qu'à la température ordinaire et 4 volumes d'acétone aussi bien que 9. On laisse ensuite reposer pendant 12 à 18 heures, en remuant de temps à autre. Le précipité est filtré, lavé à l'éther et à l'acétone, pulvérisé grossièrement et stocké *in vacuo*.

On utilise des quantités successives de 40 gr. traitées par 800 cc. d'alcool à 50 % + acide acétique à 10 %, pendant 30 minutes à 65°. Après refroidissement, on filtre (amiante) puis on traite le résidu avec une nouvelle quantité de la solution ci-dessus. Le filtrat est concentré jusqu'à ce qu'il y ait formation d'un solide (c. 15 cc.).

Le concentré est dilué avec de l'eau ad 80 cc. et purifié des suspensions solides qui l'encombrent par centrifugation.

Le liquide est alors soumis à des précipitations fractionnées par l'acétone à 0°.

Voici ce que l'on obtient :

Première fraction : précipitation granuleuse par adjonction de 80 cc. d'acétone pour 80 cc. de liquide de centrifugation.

Deuxième fraction : elle s'obtient en ajoutant 24 cc. d'acétone ; ce qui donne une masse gluante adhérant aux parois du vase.

Troisième fraction : s'obtient en ajoutant 34 cc.

Quatrième fraction : s'obtient en rajoutant un excès d'acétone, elle se présente sous la forme d'un précipité granuleux.

La première phase s'effectue rapidement. Les suivantes nécessitent chacune environ 15 heures. La dernière fraction après avoir été étendue sur une large surface, est séchée dans le vide en présence d' H_2SO_4 . On peut préalablement la laver à l'éther-alcool.

La concentration finale dépend de la technique. Il y a des pertes considérables si la précipitation ne s'effectue pas à la glacière et si la dessiccation n'est pas rapide.

On obtient 300 à 600 mgr. pour 40 gr. de poudre. Les préparations ont une teneur d'environ 2000 à 4000 μ par mgr., ce qui correspond à un pouvoir lytique de 1/2-5.000.000.

Les quantités d'acétone peuvent varier quelque peu ; celles qui sont indiquées ici donnent une préparation convenable. Les quantités d'acide acétique sont très importantes. Un arrêt prématuré du processus de concentration vers 80 cc., de même que l'éluion totale de l'acide acétique par dialyse ou neutralisation changent complètement les proportions d'acétone à utiliser.

Les fractions ne sont plus si bien séparées dans le temps et l'adjonction d'un volume d'acétone suffit à les faire précipiter toutes en même temps. La présence d'acide retient le lysozyme et le fait précipiter en dernier lieu.

La préparation obtenue ne contient pas de mucoïde. Voici les qualités obtenues dans les quatre phases :

<i>Fraction</i>	<i>Concentr. d'N.</i>	<i>Précipité avec acide flavianique</i>	<i>Nature du Précipité</i>	<i>Solubilité</i>	<i>Concentration en unités</i>
I	10,06	..	granuleux	modéré	10 μ /mg.
II	8,74	..	comme de la colle	facile	74 μ /mg.
III	11,13	léger	comme de la colle	facile	210 μ /mg.
IV	13,10	fort	granuleux	modéré- très soluble dans HCl	2000 μ /mg.

La préparation la meilleure contenait 1,94 % de soufre avec 3 % de cendres et 13,3 % d'azote.

Cristallisation :

En 1937, enfin, paraissait un travail d'Abraham et Robinson³, entrepris également sous l'impulsion du professeur Florey. Ces deux auteurs ont mis au point *une méthode de cristallisation*.

Partant de la substance purifiée obtenue par Roberts, ils réussirent cette cristallisation en une seule opération. Utilisant ce produit en solution avec de l'acide acétique N/20, ils procèdent par concentration dans un dessiccateur à vide, en présence de KOH aqueux.

Les cristaux obtenus sont des dodécaèdres. Ils sont aussi actifs que la substance initiale de Roberts. Ceux-ci ont été également étudiés à l'ultra-centrifugation : leur poids moléculaire est de l'ordre de 18.000.

L'examen de l'absorption des rayons ultra-violetes montre la bande habituelle tyrosine-tryptophane autour de 2770 Å. en solution acide ; cette valeur augmente à 2870 Å. en solution alcaline (NaOH N/10). Utilisant la méthode de Holiday, l'analyse des courbes indique la présence de 4,4 % de restes de tyrosine, de 2,2 % de restes de tryptophane dans la molécule.

PROPRIÉTÉS DE LA SUBSTANCE PURE

Wolff³⁰⁷ s'est probablement mépris sur la chimie de cette enzyme : il prétend que sa préparation ne contient ni H, ni S, ni P ; aucune réaction spécifique des protéines n'est positive ; malgré cela il constate qu'elle est digérée en une heure à 37° par la trypsine !

D'après Meyer et ses collaborateurs, leur substance présente les réactions positives suivantes :

Biuret, acide glyoxylique, phénol de Greenberg, acide nitroprussique.

Molish réaction négative.

Le brome dans l'acide acétique glacial est décoloré.

Le lysozyme est précipité par l'acide perchlorique, incomplètement par l'acide tungsténique ; il est précipité et inactivé par les sels de métaux lourds, par exemple : or, argent.

L'acide trichloracétique et sulfosalicylique n'ont pas d'action.

Le lysozyme est inactivé et précipité par KI, I et Cu₂O, inactivation réversible par saturation avec H₂S et HCN.

Les peroxydes ont une influence nette, celle-ci disparaît si on les précipite par la dioxane.

Cette sensibilité aux iodures et peroxydes permet de supposer la présence d'un groupe sulfhydrile intact dans la molécule.

Il est thermo et acidostable. Il supporte sans dommage un chauffage de 45 minutes à 100° (en solution dans l'acide acétique à 2 %). Dans une solution à un pH neutre traité de la même façon, il perd presque toute son acidité. De même une solution de lysozyme NaOH, 0,01/N voit son activité diminuée de 3000 μ par mgr. jusqu'à 800 μ par mgr.

Par cette méthode on obtient une substance dont les propriétés sont celles d'un *polypeptide basique* contenant 15,3 % d'N. Il est difficile de concevoir une substance comme celle que décrit Wolff³⁰⁷, qui ne contiendrait pas d'N, ne donnerait pas de sucres réduits après hydrolyse, d'un poids moléculaire aussi élevé, soluble uniquement dans l'eau. A la différence de Wolff, les auteurs ont pu facilement extraire le lysozyme adsorbé aux huiles au moyen de l'éther de pétrole.

La puissance lytique est environ la même que celle de Wolff.

D'après Schwachman, Hellerman et Cohen²⁷³, l'hémolysine pneumococique peut être oxydée et réduite (seule forme active); ce processus est réversible; il va de même pour le lysozyme; sa forme active doit être la forme réduite, ce qui permet d'accorder un rôle certain au peroxyde dans la défense des bactéries contre les agents lytiques (lysozyme en particulier). Cela explique aussi la résistance diminuée aux infections dans l'avitaminose A, l'organisme ayant alors de la peine à maintenir des substances sous forme réduite.

La préparation de Roberts²⁵⁴ diffère passablement de celle de Meyer pour certaines propriétés²⁰⁶.

Les voici :

Modérément soluble dans l'eau salée normale, elle augmente par adjonction d'acide (grâce à ses propriétés basiques); elle est insoluble dans les solvants organiques; elle se conserve pendant plusieurs semaines à la glacière sans perte d'activité.

Réaction spécifique des protéines positives :

Xanthoprotéique, biuret, Miller, acide glyoxylique, arginine.

Elle précipite avec l'acide trichloracétique et sulfosalicylique, avec un excès d'alcool et d'acétone également dans l'eau, par saturation avec le sulfate d'ammonium.

Elle est acido et thermostable, elle peut être chauffée à 100° en solution acide sans dommage. Sous forme de flavianate et de styphnate, elle change d'état, phénomène qui est réversible semblablement à ce qui se passe avec la trypsine (Northrop 1933). Cette réversibilité a pu être prouvée jusqu'à un $\text{pH} = 4$ à 70°. Après alcalinisation, elle coagule en solution plus concentrée, mais peut être précipitée à température ordinaire.

Son point isoélectrique est autour de $\text{pH} = 7$. Comme toutes les protéines, elle est adsorbée par le fer colloïdal. De plus dans le blanc d'œuf naturel, il semble y avoir une substance protectrice qui permet au lysozyme de rester en solution et empêche l'action du fer colloïdal. Quoique le blanc d'œuf n'écume pas facilement en se concentrant, le lysozyme, par contre, le fait très facilement dès qu'on le secoue.

Cette préparation est inactivée et change d'état après filtration à la bougie. La rapidité avec laquelle cela se passe à la surface de contact air/eau est démontrée par son étalement sur la surface de l'eau. Il n'a pas été possible de déterminer si les pellicules formées étaient réellement rigides ou simplement visqueuses.

Il jouit également de la propriété intéressante d'émulsionner le chloroforme; les gouttelettes examinées au microscope semblent couvertes d'une membrane ridée. Le lysozyme doit donc changer d'état à une surface de contact eau/chloroforme. Du fait de sa nature basique, il forme facilement des sels avec des acides et donne un précipité avec: l'acide flavianique, picrique, styphnique, picrolonique et Reinecke.

La production de flavianate se fait essentiellement par portion distincte, ce qui permet de présumer de la très grande pureté de cette préparation.

Ce sel contient 3,1 % de soufre. Cette augmentation relativement considérable de la teneur en soufre de la molécule, pour la formation d'un sel par un acide ne contenant qu'un atome de soufre, indique, soit que la base se combine avec plusieurs molécules d'acide flavianique, soit que la base a un poids moléculaire anormalement bas pour une protéine. Une autre preuve en faveur de cette hypothèse, c'est la facilité avec laquelle s'effectue la dialyse, à travers la cellophane par exemple (le collodion et les vessies de poissons, par contre, sont imperméables). Rappelons que le bleu de méthylène a un comportement analogue.

L'ensemble de ces faits permet d'affirmer que l'on possède ainsi une préparation ayant un très haut degré de pureté. Elle diffère de celle de Meyer par le % d'azote (13,3 - 15,3), celui du soufre, plus élevé (2,01 - 0,64).

Lors d'une étude ultérieure avec du lysozyme de salive, les constantes de sédimentation ont été établies à l'ultra-centrifugeuse : elles sont de $1,95 \times 10^{-13}$ pour le blanc d'œuf et de $2,10 \times 10^{-13}$ pour la salive. Ces constantes donnent un poids moléculaire de 17.600, ce qui correspond à l'une des *unités fondamentales* de la structure protéinique, ainsi que l'a montré Svedberg (1937).

Elle diffère enfin par l'absence de précipité avec l'acide trichloracétique et sulfosalicylique. L'échantillon de Meyer et ses collaborateurs était donc certainement imparfait, de plus la valeur du produit de Roberts peut encore être soulignée par le fait qu'une seule opération a suffi pour en faire la cristallisation.

SA NATURE

Dès sa première communication, Fleming estime qu'il s'agit d'une substance du genre des *ferments* ; presque tous les auteurs qui se sont occupés du lysozyme ont émis une opinion à ce sujet, néanmoins c'est l'hypothèse de Fleming qui s'est de plus en plus imposée.

Wolff, après ses essais de purification de 1927, pense qu'on est en présence d'un colloïde neutre ou électropositif, de nature non albumineuse.

Kigasawa, en 1927^{144, 145}, estime qu'il s'agit d'une forme de réaction propre à l'organisme à caractéristiques tout à fait spéciales ; il ne peut se prononcer sur sa nature, il estime l'opinion de Suranyi²⁸⁰ (nature fermentative) prématurée. Ce qui lui paraît curieux cependant, c'est son action élective pour certaines bactéries. Il semble qu'il faut une constitution spéciale du corps bactérien, une composition propre peut-être pour être sensible au lysozyme ; celle-ci ferait défaut aux microorganismes résistants. (On voit apparaître ici la notion du substrat.) Son effet restera limité à ces mêmes bactéries et l'espoir de pouvoir étendre son action à d'autres bactéries lui paraît vain. Il envisage l'hypothèse d'un mécanisme antilysozyme chez les bactéries résistantes, car il lui semble difficile d'admettre des différences dans la constitution propre de deux sarcines prélevées dans l'air d'un même local et possédant une ressemblance morphologique et culturelle

si complète, tout en étant l'une fortement sensible, et l'autre pas du tout : le lysozyme provoquerait des différences de pH auxquelles les bactéries seraient hypersensibles.

C'est principalement Hallauer (1929) ¹¹⁸, Bujanowskaja et Jelmoljeva (1931) ¹³⁸ qui affirment la notion de ferment et essayent de le prouver.

Pour Hallauer ¹¹⁸, les faits suivants parlent essentiellement en faveur d'une nature fermentative. D'abord, l'inépuisable de son effet qui indique un processus catalytique, l'extrême sensibilité aux variations les plus légères du pH, à l'adjonction de sels ou de base, sa thermolabilité (dépendant de la forme sous laquelle il est dissous), surtout le fait qu'il répond bien à la loi d'après laquelle les processus sont d'autant plus rapides que la température est plus élevée, tout en présentant en plus un optimum vers 60°.

Il est bien dans la nature d'un ferment d'agir comme catalyseur, ce qui semble être confirmé par son action toujours égale ; si elle diminue parfois après plusieurs lyses, comme nous l'avons déjà remarqué plus haut, c'est uniquement le fait de produits bactériens mis en solution par la lyse.

L'effet des peptones (inhibition) est conforme à ce qu'on voit chez les ferments (Abderhalden, Zünz, Willstätter).

Jelmoljeva et Bujanowskaja ¹³⁷ confirment toutes ces données et y ajoutent la grande tendance à faire de l'adsorption. D'autre part, l'augmentation de la température est spécialement bien montrée par la néphélométrie : une augmentation de la température à 20° provoque une augmentation de l'effet de 8 fois. Le quotient de la température est d'environ 4 pour l'intervalle de 17 à 37°. Cette évolution de la réaction de lyse par rapport à l'évolution de la température est caractéristique.

Ils ont enfin réussi à mettre en évidence, à partir du lysozyme de larmes, toute une série de ferments : tryptase, oxydoréductase ainsi qu'un ferment protéolytique.

Dès lors, l'hypothèse primitive de Fleming paraît bien établie. On va chercher maintenant à définir ce nouveau ferment, à pénétrer son mécanisme d'action et pour cela les recherches vont porter sur :

1. Le ferment lui-même.
2. Le substrat.
3. Les produits mis en solution par la réaction de lyse.

On le voit, ce sont les trois termes habituels qui régissent l'étude générale des oxydations biologiques fermentatives.

Dès 1930, Penrose et Quastel ²²⁴ étudient l'influence de la lyse par le lysozyme sur l'activité et la structure cellulaires.

Depuis les expériences classiques de Warburg, Batelli et Stern ^{292, 21}, l'importance de cette structure avait été bien mise en évidence. En effet, on a généralement admis que les oxydations enzymatiques sont des *réactions de surface*.

Un examen d'ensemble des systèmes d'oxydation montre qu'il doit y avoir une gradation considérable dans la complexité et la stabilité de certaines structures. S'il est possible d'extraire certains agents, tels les oxydants des aldéhydes et des purines, un grand nombre ne peut être mis en évidence qu'en altérant la structure cellulaire. De sorte qu'on doit admettre que l'activité cellulaire est au fond dépendante de la structure cellulaire. La désintégration de celle-ci, la rupture de sa membrane, amènent en contact des produits qui ne le sont normalement pas, ce qui influence évidemment les produits finaux.

Par contre, l'activité des catalyseurs ne sera pas nécessairement entravée par cette désintégration. Les auteurs ont donc étudié le comportement de divers ferments du *M. lysodeicus* sous l'effet du lysozyme.

La déhydrogénase représente l'un des éléments les plus importants des processus biologiques. Les acides lactiques, glutaminiques, succiniques et glycérophosphoriques, le glucose et le lévulose agissent comme donateurs d'oxygène. Or, la lyse amène l'élimination complète, quelquefois partielle (70 % au minimum), des donateurs d'oxygène. Sur les processus aérobies, la lyse amène également une diminution de l'absorption d'oxygène de près de 90 %. L'activité des déhydrogénases dans l'ensemble dépend donc de la structure cellulaire.

Le phénylène diaminé ne paraît pas affecté par les modifications de structure : la lyse produit une augmentation de son activité. Il en va de même des peroxydases ; la lyse amène une augmentation considérable de l'activité des peroxydes d'hydrogène.

Il semble que l'agent lytique exerce déjà un effet avant la lyse en provoquant une décomposition plus rapide de H_2O_2 . Des expériences semblables effectuées avec le *B. coli* (insensible au lysozyme) ne montrent aucune différence ni pour la catalase ni pour les déhydrogénases.

L'explication la plus simple est que l'agent lytique effectue rapidement un changement dans la *surface cellulaire* par laquelle la perméabilité pour les peroxydes est augmentée.

Le fumarase et l'uréase montrent un phénomène analogue. C'est donc surtout l'activité de l'hydrogène qui semble dépendante de la structure cellulaire.

Or, si dans cette oxydation il s'agit bien d'un phénomène de surface, elle sera assimilable à une *réaction hétérogène* se passant à la surface de contact solide/liquide, dit Barron en 1936²¹; la vitesse de réaction, cette caractéristique essentielle de chaque ferment (Schaeffer), devient calculable. Ces recherches basées sur la réaction d'oxydation typique de cette espèce, celle de l'acide pyruvique par l' α -ketose-oxydase, ont montré qu'elle peut être formulée, sur la base des données cinétiques expérimentales, par des équations dérivées de l'*isotherme d'adsorption* de Langmuir¹⁶⁵.

Le rapport étroit trouvé entre la vitesse de réaction et l'équation générale de l'isotherme d'adsorption de Langmuir, malgré les difficultés techniques, est une preuve suffisante que celle-ci doit bien être considérée comme une *réaction hétérogène*.

D'autre part, on peut admettre qu'il existe à la surface des cellules des *centres actifs*, sélectifs où l'activation du substrat s'effectue. Taylor²¹ a exprimé l'idée qu'une partie très faible de la surface était nécessairement active pour catalyser une réaction donnée. L'hypothèse que la surface des catalyseurs hétérogènes présente des zones d'activité variable est une aide certaine pour l'interprétation de cette classe d'oxydations (Théorie de Quastel).

Ces considérations tirées de l'examen de la réaction d'oxydation de l'acide pyruvique par l' α -kétose oxydase sont-elles intégralement applicables au lysozyme, comme semble l'admettre Barron, les recherches ne paraissent pas encore suffisamment avancées pour qu'on en ait la preuve directe. Néanmoins, deux travaux importants ont été publiés concernant spécialement le substrat et les substances mises en solution par son activité.

Meyer et ses collaborateurs²⁰⁷ en 1935, étudiant *le point d'attaque du lysozyme*, écartent l'idée d'un processus physicochimique, par exemple la tension superficielle; ils constatent que les bactéries sensibles contiennent du lysozyme; son action produit une augmentation de l'azote non protéique, du phosphore inorganique et des substances réduites. Ils confirment l'hypothèse de Hallauer, d'après laquelle c'est un *mucoïde* de la sarcine qui est attaqué. Ils estiment que c'est l'explication de son pouvoir bactéricide et que l'augmentation de N. non protéique et de P. inorganique

provient de la libération de substances enfermées par la membrane cellulaire.

Il semble que cette action s'exerce sur l'une des liaisons *hydrocarbonées* de certains mucoïdes. La nature de cette liaison (qui n'est pas α -glucosidique) est inconnue. Cette action est absolument spécifique, car une quantité de glycoprotéides et de polysaccharides n'y sont pas sensibles.

Le maximum de groupes réducteurs émis est, chez les sarcines, d'environ 1/3 de la puissance réductrice totale après hydrolyse acide. Il est concevable que le premier effet du lysozyme sur la sarcine consiste dans la désagrégation des agrégats de micelles mucoïdes d'une manière semblable à celle de la première phase de l'action des diastases sur l'amidon. Les auteurs ont trouvé que les mucoïdes et polysaccharides de l'œuf étaient attaqués de la même manière que les substrats bactériens uniquement en l'absence d'hydrolyse alcaline pendant la phase de préparation. D'ailleurs, les substrats bactériens perdent également leur sensibilité après une hydrolyse alcaline poussée. Or, l'action de l'anhydride acétique dans de la pyridine, double la quantité de substance réductrice libérée et ceci avec la même préparation ; cela permet d'affirmer que cette hypersensibilité correspond à la suppression d'un groupe acétyl (*cf.* Avery et Goebel¹⁴ : sur le rôle des groupes acétyls dans le comportement immunologique des polysaccharides du pneumocoque).

Les mucoïdes sont généralement résistants à l'action des enzymes protéolytiques : l'effet inhibiteur des préparations de blanc d'œuf sur la digestion tryptique est probablement dû à ce fait.

Avery et Cullen¹³ ont obtenu une enzyme à partir de divers pneumocoques, qui rend les bactéries G^- ; à haute concentration, ce ferment amène la lyse de la membrane bactérienne. Dubos a réussi à prouver que les préparations de lysozyme purifié ont la même activité. Ces deux enzymes, malgré les ressemblances de leurs propriétés, ne sont cependant pas identiques.

Les auteurs ont spécialement cherché à obtenir du lysozyme à partir d'un nombre aussi grand que possible de substrats. Ils en ont obtenu de toutes les bactéries sensibles étudiées ; par contre, aucun à partir du *B. coli* (résistant). Ils ont fait la preuve de l'augmentation en solution de sucres réducteurs pendant la lyse à partir de mucoïdes et de polysaccharides et d'une partie du blanc d'œuf ; ils ont prouvé l'augmentation de N. non protéique dans la solution.

Le lysozyme n'a aucune action semblable à une protéase, à une phosphatase ou à une lipase.

Par contre, le type de liaison attaqué n'a pas été défini. Le substrat lui-même ne contient pas de protéine, il doit être formé de *polysaccharides* contenant de l'azote de la classe des mucoïdes.

Pour Epstein et Chain 1940⁸², cette augmentation des sucres réducteurs permet de supposer que le lysozyme est une *carbohydrase*, sans que c'en soit la preuve formelle. Ces deux auteurs mirent alors au point une méthode de production en masse de *M. lysodeicus*, puis une technique pour l'obtention du substrat.

Ils déterminent sa présence par celle des sucres réducteurs mis en solution, puis par la présence de N. acétylhexoseamine. Après extraction et purification, le substrat présente les propriétés suivantes : C'est une poudre légèrement brunâtre facilement soluble dans l'eau : elle donne une solution visqueuse dans la formamide, l'éthylène glycol glacial, l'alcool dilué. Elle est insoluble dans l'alcool absolu, l'acétone, l'éther, le chloroforme, le M. crésol, la pyridine sèche, la dioxane.

Son poids moléculaire est élevé ; elle n'est pas dialysable au travers d'une membrane de collodion ou de cellophane.

Elle ne contient pas de protéines et donne une solution claire avec l'acide trichloracétique. L'effet du lysozyme se marque par le fait qu'environ 50 % du substrat devient facilement dialysable et soluble dans l'alcool méthylique ; on en peut déduire qu'environ 50 % au moins est du substrat pur. Les 50 % restants n'étaient pas hydrolysés et contenaient principalement d'autres hydrates de carbone et polypeptides.

Elle présente une Molish réaction forte.

Comme l'analyse directe du substrat se révéla difficile, les auteurs ont cherché à étudier les produits de l'action du lysozyme sur le substrat. Ils établirent également une *technique spéciale* pour obtenir ces produits.

L'analyse élémentaire des produits obtenus donne : N. total = 6,4 % H = 6 % C = 45 %.

L'azote protéinique a une valeur identique à celle de l'azote total ; tout l'azote des produits de lyse se présente donc sous forme de groupes aminés dont toutes les liaisons sont bloquées. La réaction au biuret est négative, il n'y a donc pas de liaison peptique.

Groupe acétyl : 11,4 - 13,4 % suivant les méthodes (on a obtenu un résultat semblable avec des hydrolysats d'acide hyaluronique).

N. acétyl-hexoseamine : au minimum 30 % de l'ensemble des produits de lyse en sont formés, avec l'ensemble des groupes acétyl on arrive à 58 % environ. Il n'y aurait qu'une petite partie (10 %) sous forme libre, tout le reste serait lié sous forme d'oligosaccharides.

Pouvoir réducteur : 13,2 % primitivement, puis augmente après hydrolyse par $\text{HCl}2\text{N}$ à 100° jusqu'à 40 %.

Ketohexoses : (fructose) on a obtenu un grand nombre de réactions colorées, la méthode quantitative donne environ 3 %.

D'après ces indications, on peut penser que *les produits de lyse* obtenus par l'action du lysozyme *consistent principalement en un mélange de mono et d'oligosaccharides* ; leurs principaux constituants étant une N-acétylhexoseamine et une ketoseamine. Aucune de ces deux substances n'a pu jusqu'ici être vraiment définie et identifiée avec un sucre connu. On n'a pas pu mettre en évidence ni acides hexuroniques ni galactoses, ni mannoses ou pentoses.

Propriétés du substrat naturel : on constate des différences de sensibilités marquées entre le substrat naturel intact et le substrat isolé par l'une ou l'autre méthode chimique (formamide par exemple) ou mécanique. La charpente du substrat naturel est absolument insoluble, elle n'est pas digérée par la pepsine. Elle doit donc exister sous une forme différente de celle sous laquelle on l'obtient en l'isolant, dans les bactéries vivantes, probablement sous une forme plus fortement polymérisée ou encore liée à une protéine, résistant à l'action de la pepsine.

Diverses bactéries furent étudiées, les bactéries résistantes, *B. subtilis* et un bacille G⁻ ne furent pas lysés, mais rapidement tués, ce qui fut démontré par l'inhibition complète de la respiration et la stérilité totale des cultures après une heure d'incubation avec le lysozyme. La lyse n'est donc pas un critère suffisant. Les bactéries réfractaires ne contiennent pas de substrat.

Finalement Epstein et Chain⁸² étudient l'action du lysozyme à divers pH en utilisant du substrat purifié et du lysozyme purifié d'après Roberts²⁵⁴. On constate que son action s'étend de pH 2 -9 ; il a donc un comportement identique à la hyaluronidase du testicule (spreading factor de Chain et Duthie ; 1940). Ces deux carboxhydases sont également sensibles aux modifications de surface : chloroforme par exemple.

A l'état naturel cependant son action s'exerce dans les limites de pH étroites. L'insolubilité des protéines pour ces valeurs en est

probablement l'explication ; elle est également celle du phénomène de Nakamura. Malgré l'absence de lyse, le substrat est attaqué, la lyse ne s'effectue cependant qu'à un pH alcalin : pH favorable à la solubilité des protéines ; l'extraordinaire rapidité de la lyse dès qu'on neutralise apporte la preuve que l'action du lysozyme s'est pleinement exercée malgré le pH défavorable.

A la lumière de ces faits, on voit que *le lysozyme est une enzyme hydrolysant un polysaccharide insoluble dans l'eau*, contenu dans le corps des bactéries sensibles, de poids moléculaire élevé ; *il appartient à la classe des carbohydrases*.

Ce polysaccharide est dégradé en produit soluble dans l'eau et ce processus peut être accompagné par la lyse complète de certaines bactéries. Pour celle-ci, le polysaccharide est un produit essentiel au maintien de leur structure morphologique, apparemment même d'une importance plus grande que celle des protéines puisque les enzymes protéolytiques ne peuvent provoquer la lyse de ces organismes. *Le processus d'action du lysozyme est une hydrolyse*.

Pour d'autres organismes sensibles au lysozyme, tels que *B. subtilis* et *anthracis*, l'hydrolyse n'est pas suivie de lyse. Pour celle-ci, le substrat sensible au lysozyme peut être détruit sans que l'intégrité de leur structure morphologique soit touchée ; celui-ci doit cependant exercer des fonctions vitales, car sa disparition par l'hydrolyse amène la mort instantanée de ces bactéries.

La lyse, pour les bactéries lysables, *ne se produit que si toutes les substances, dont dépend la structure cellulaire, sont solubles dans l'eau* après l'action du lysozyme. L'état des protéines bactériennes revêt une importance toute particulière. Il n'y a pas de lyse possible si celles-ci sont altérées par exemple par la chaleur, l'iode ou les solvants organiques.

Tel est l'état actuel des recherches sur la nature et le mécanisme du lysozyme, qui furent malheureusement interrompues du fait de la guerre. Malgré les précisions déjà obtenues, il reste, comme le remarquent Epstein et Chain, bien des points obscurs, auxquels devront s'attaquer les recherches subséquentes.

SES RAPPORTS AVEC LE BACTÉRIOPHAGE

Si l'on considère l'action d'un agent bactéricide biologique, on peut se trouver en présence de deux processus opposés :

1. Celui d'un agent bactéricide dans le sérum sanguin : d'une part son effet peut être amplifié en procédant à l'immunisation de l'animal, d'autre part, il est connu depuis longtemps que celui-ci peut être complètement supprimé en le saturant par les microbes envers lesquels il est actif. Il semble qu'il y ait *combinaison* entre l'agent bactéricide et la bactérie ; le résultat en sera la fixation complète et définitive de l'agent bactéricide sur le microorganisme.

2. Celui du bactériophage, où l'adjonction d'une faible quantité à une jeune culture amène une *production* très forte de substance lytique.

La lyse par le lysozyme présente à première vue des analogies certaines avec l'un et l'autre de ces modes. Le paragraphe consacré aux propriétés antigéniques a montré qu'il n'y avait aucune parenté avec le premier ; celui-ci étudiera ce qu'il en est du bactériophage.

Il y a un certain nombre de propriétés semblables : elles portent essentiellement sur l'influence des phénomènes externes : la lumière et la température, son comportement vis-à-vis des corps chimiques et les qualités d'adsorption. Les images microscopiques des bactéries ayant subi l'action du lysozyme sont semblables à celles produites sous l'influence du bactériophage. Mais, à part ces quelques faits, on se trouve en présence de différences considérables.

L'effet du bactériophage est supprimé par la gélatine ; or, même des concentrations très élevées n'inhibent en rien l'effet lysozymique. Cet effet s'exécute en quelques minutes alors que le bactériophage réclame un temps d'incubation beaucoup plus considérable.

Les bactériophages de diverses provenances exercent une action *spécifique* : les souches résistantes à l'un d'eux ne le sont pas aux autres. Avec le lysozyme, rien de pareil : une souche résistante l'est envers n'importe lesquels d'entre eux.

Une différence également fondamentale est l'action égale du lysozyme envers les bactéries mortes ou vivantes : l'effet phagique ne s'exerce que contre des cellules *vivantes*. Il peut s'exercer et se répéter presque indéfiniment avec des cultures infectées par le bactériophage. Par contre, les cocci qui survivent à l'effet lysozymique donnent des cultures normales ; leur filtrat n'a aucun effet lytique.

Le phénomène de Nakamura²¹⁷ ne se retrouve pas chez le bactériophage ; le pH n'y joue également pas un rôle aussi impérieux ; il doit simplement être maintenu dans les limites compatibles avec les conditions de vie des bactéries.

Enfin, d'après Suranyi²⁸⁰, l'action des phages s'exerce sur les bactéries G⁻ et les bactéries pathogènes, celle du lysozyme sur les microorganismes G⁺ et les saprophytes.

Le bactériophage semble être lié à des éléments corpusculaires, ce qui n'est pas le cas pour le lysozyme.

Il existe aussi des différences dans la filtration, d'après Fleming⁹³.

Il sera facile de multiplier les différences qu'on constate entre ces deux substances. Quoique, d'après Hallauer, il faudrait se garder de faire les différences trop absolues, celles qui viennent d'être énumérées suffisent à démontrer *qu'il s'agit de deux corps fondamentalement différents*.

Après avoir passé en revue les différences, soit dans les qualités physiques et chimiques, soit dans le mode ou le rayon d'action, il reste à rendre compte de certaines recherches entreprises depuis 1935 et qui tendent à montrer que loin de se confondre avec le bactériophage, *le lysozyme s'oppose activement à son action* et provoque la scission de l'union entre le phage et le B. megatherium sensible.

Ce fait a été rapporté d'abord par Wollmann et Wollmann³⁰⁸. Il semble qu'il s'agit d'un effet spécifique car le broyage avec des perles de verre ou l'effet de la trypsine n'augmente pas la concentration en phage.

Gratia (1936)¹¹³ ne put répéter cette expérience avec la même souche, mais B. White^{303, 304} obtint un effet semblable en utilisant une souche faiblement lysogène de vibriions cholériques.

Les mécanismes chimiques de l'adsorption, de la multiplication et de la libération des phages sont peu connus ; il semble que l'étude de ce phénomène pourrait apporter des précisions intéressantes pour l'un et l'autre mode antibactérien.

Elle a été entreprise par Pirie en 1940²³⁴. Auparavant, Meyer avait montré que le lysozyme est une carbohydrase qui hydrolyse une fraction polysaccharide des mucines de l'œuf et des bactéries. Or, on pense que le phage est fixé, en premier lieu, aux polysaccharides spécifiques de la surface bactérienne ; par conséquent dans le cas particulier l'action du lysozyme provoquera l'hydrolyse de ce polysaccharide avec libération subséquente du phage.

L'auteur a utilisé la même souche que Wollmann ; elle s'est spécialement intéressée au mode d'union du phage avec les bactéries tuées par la chaleur ; beaucoup de phages sont, en effet, adsorbés spécifiquement aux bactéries sensibles tuées par la chaleur et peuvent être séparés de la solution par ce moyen.

Les expériences ont montré que le lysozyme hydrolyse un hydrate de carbone présent dans la bactérie, ce qui libère les phages d'avec les bactéries tuées par la chaleur ; après avoir subi l'action du lysozyme, les bactéries ne peuvent plus adsorber de phages.

Il n'existe pas de preuve directe que ces processus soient en relation les uns les autres, mais il est certain que les polysaccharides d'autres bactéries adsorbent ces phages (White 1936)³⁰³ et que, si un phage intervient, la lyse des bactéries est accompagnée par l'hydrolyse des hydrates de carbone bactériens (Pirie 1939)²³³.

Le confrontation de ces preuves suggère que la libération des phages pendant la lyse peut être due au moins partiellement à la rupture de l'union entre phages et polysaccharides bactériens.

APPLICATION PRATIQUE DU LYSOZYME

Malgré les succès des sulfonamides et des acridines, puis de la pénicilline, on réclame toujours de nouveaux antiseptiques locaux. Aussi, peu après la découverte de Fleming, on a examiné les possibilités d'application pratique du lysozyme. Fleming lui-même y avait déjà pensé et avait suggéré, par exemple, l'emploi du lysozyme dans les cas de septicémie à streptocoque faecalis ; ses études sur les antiseptiques en général, conduites avec des méthodes identiques à celles qui furent utilisées pour l'étude des propriétés du lysozyme, en font foi.

Néanmoins, ce n'est qu'après plusieurs années que les essais ont pratiquement commencé.

Dès 1928, Ridley^{251, 252} fait plusieurs observations intéressantes en *pathologie oculaire* ; il remarque que dès que la concentration du lysozyme baisse dans les larmes, il y a de l'écoulement ; dans 5 cas de rétention de corps étrangers (d'une durée de plus de 3 jours) la concentration tombe à 45 % de sa valeur normale. De plus, dans 16 cas de conjonctivite aiguë et chronique, la teneur était diminuée de 30 à 60 % par rapport à la concentration normale d'un œil normal.

Dans 6 cas de phlyctène et dans 4 cas de kératite interstitielle récente, la concentration du lysozyme fut de 55 % au-dessous de la normale. Il ajoute que le lysozyme en substance pure est fortement antiseptique et que les tissus le supportant en concentration 40 fois supérieure à la normale (larmes).

Cavka et Prica (1929) ⁴⁵ confirment ces expériences ; pour eux, cependant, la teneur en lysozyme ne subit pas de changement dans les cas de conjonctivite chronique. (L'effet de médicament comme le targesin, le collargol, l'acide borique est très variable, celui du sulfate de zinc à 0,5 % est nul.)

Hallauer ¹¹⁹ étudie 120 cas d'inflammations aiguës et chroniques de la cornée. Il constate toujours une diminution de lysozyme dans les cas d'irritations aiguës avec fortes sécrétions lacrymales, ainsi que dans les affections sur base scrofuleuse ou de diathèse lymphatique. La teneur du lysozyme lui semble donc fortement dépendante de l'activité sécrétoire de la glande lacrymale, sa diminution étant l'indice primaire d'une maladie générale ou secondaire suivi d'une hypersécrétion réflexe. Par l'atropine, il obtient une diminution de l'hypersécrétion réflexe et parallèlement du lysozyme, avec la pilocarpine l'effet contraire.

La signification du lysozyme comme substance antibactérienne de protection est indéniable ; l'effet bactéricide et inhibiteur sur la croissance des microorganismes dépend de la concentration en lysozyme. Cette action protectrice s'étend jusqu'à une concentration de 1/10.000, au delà elle cesse.

Thérapeutiquement, on peut provoquer une augmentation du lysozyme par la suppression de l'épiphora (par l'atropinescopolamine) ou par instillation de lysozyme de blanc d'œuf de poule.

Pour Ridley ²⁵¹, il y aurait une concentration abaissée du lysozyme dans la syphilis congénitale.

Des expériences entreprises concurremment par Findlay ⁸⁶, Jelmoljava et Bujanowskaja ¹³⁷ ont étudié le rôle du lysozyme dans le syndrome de la kératomalacie provoqué par l'avitaminose A.

De jeunes rats furent nourris avec des aliments sans graisse (sans vitamine A) ; chez une partie de ces animaux, on humecta journellement la cornée avec du lysozyme de larmes humaines. Tous les rats perdirent du poids, mais ceux qui n'avaient pas reçu de lysozyme firent une kératomalacie. Parmi les autres, un seul subit un trouble passager de la cornée. L'examen de la sécrétion conjonctivale des rats malades montra qu'elle ne contenait plus aucune trace de lysozyme.

Il semble donc bien que la cause de la diminution du pouvoir de défense de la muqueuse et celle du développement de processus microbiens (staphylocoques Ridley)²⁵¹ soit due au *manque en lysozyme*. Celui-ci serait suffisant pour provoquer des troubles et même des ulcérations de la cornée. Un autre exemple de l'effet local du lysozyme fut le résultat heureux d'un traitement de Highmorite ; on réussit à arrêter le processus pathologique par l'application de tampons imbibés de lysozyme nasal prélevé du côté sain. Une semaine après, l'écoulement purulent cessait, les streptocoques avaient disparu de l'antre malade.

Il semble que le lysozyme puisse trouver également son application en rhino-laryngologie.

En 1935, Melnik et Natanson¹⁹⁷, confirment le rôle du lysozyme en pathologie oculaire ; ils préconisent des instillations dans les cas de blépharite et de conjonctivite aiguë et chronique.

Melnik, Jourbine et Kolesnikov¹⁹⁶ font également la preuve de la présence du lysozyme dans les selles de nourrisson nourri par la mère ; ils constatent une influence certaine sur la flore intestinale normale et en signalent l'absence dans les indigestions ; ils lui attribuent un rôle curatif dans les troubles intestinaux du nourrisson (traitement d'usage des diarrhées infantiles par le blanc d'œuf).

Ils ont traité avec succès l'angine catarrhale ou scarlatineuse par le lysozyme en poudre et des lésions cutanées de varicelle par des pansements au lysozyme.

Reprenant les expériences avec les rats carencés en vitamines A, ils constatent un taux plus élevé de lysozyme dans les tissus chez les rats carencés que chez les rats normaux. Ils concluent que dans le mécanisme de défense de l'organisme du rat, le lysozyme n'est pas influencé par la vitamine A. Le défaut d'action antibactérien serait compensé par l'augmentation du taux du lysozyme dans les tissus, mais l'ingestion en excès de lysozyme chez les rats carencés ne favorise pas son accumulation dans les tissus.

Wolff³⁰⁶ fait également des expériences sur l'animal, il fait des injections intraveineuses ou sous-cutanées. Il n'a jamais constaté un effet nocif, même en continuant les injections pendant des mois.

Peu après l'injection, on le retrouve dans le sérum, mais très rapidement le lysozyme disparaîtrait ; on en retrouve une partie dans l'urine. Constatations curieuses : l'injection, provoquerait une leucopénie immédiate après l'injection suivie d'une leucocytose (jusqu'à

45.000); celle-ci ne se retrouverait cependant pas dans tous les cas, seule la leucopénie est constante.

Pour l'auteur, la disparition du lysozyme s'expliquerait par sa solubilité dans les lipoides; il s'y accumulerait et y serait si bien fixé qu'il lui est impossible de réapparaître en solution aqueuse³⁰⁷.

Les recherches de Roberts²⁵⁴ en 1937 ont confirmé ces faits; étudiant les propriétés de la substance pure, il note *l'extrême facilité* de diffusion du lysozyme. Immédiatement après l'injection sous-cutanée ou intraveineuse, on peut mettre en évidence son activité dans le sérum. Sa teneur baisse cependant rapidement jusqu'à atteindre la concentration normale de cette humeur.

On la retrouve dans l'urine des animaux injectés quoique aucune autre protéine n'est excrétée par le rein. Comme la puissance lytique du lysozyme est la même dans l'urine et dans le sang, il se peut que les résultats de Wolff soient dus à la filtration glomérulaire.

Hendrix, Westfall et Richards en 1936¹²⁶ ont obtenu un résultat semblable avec l'inuline (poids moléculaire = 5000) sans dommage pour le rein. Il ne semble pas y avoir de raisons pour lesquelles il n'en serait pas de même avec le lysozyme.

D'autre part, Melnik^{187, 183, 190} et Tcherviakov, préparent des *vaccins* en produisant la mort des bactéries par le lysozyme. Ayant ainsi préparé des lysats B. dysentérique, ils constatent que son pouvoir antigénique, se traduisant par le degré d'immunité vis-à-vis de la toxine dysentérique chez le lapin, est égal à celui de l'anatoxine dysentérique précipitée.

Des expériences identiques montrent que ce pouvoir est très faible avec des lysats obtenus par le bactériophage.

De même, l'administration de lysats de B. typhique^{188, 191} obtenus avec le lysozyme confère aux animaux une immunité assez élevée vis-à-vis de l'inoculation de B. typhique vivant.

Ces faits furent largement utilisés en pratique par Melnik et Tcherviakov chez le cobaye, par voie intradermique, et chez l'homme par voie sous-cutanée¹⁹¹.

Utilisé en pansement, le lysozyme guérit les pyodermites staphylocociques et streptocociques ainsi que les ulcères trophiques infectés. Cette méthode peut servir de traitement auxiliaire dans les cas de sycosis et pyodermite chronique¹⁹³.

On peut rapprocher ces faits de constatations de Cazassa⁴⁴ concernant la *physiopathologie* de la peau. Le lysozyme interviendrait dans

divers états normaux et pathologiques de la peau ainsi que dans les réactions de défense contre les infections cutanées.

Melnik et Zeitlin²⁰⁰ l'ont utilisé en technique chirurgicale également, *en pansement sur des plaies opératoires* (ostéomyélite, phlegmon paranéphrite, sur les surfaces granuleuses contaminées). Le lysozyme atténue les symptômes inflammatoires.

En 1940 D.-J. Ponomarewa²³⁶ obtient également d'excellents résultats *en application directe sur des blessures purulentes*. Le lysozyme lyse les agents du pus, nettoie la plaie et aide visiblement à amener une guérison plus rapide. Le lysozyme agit spécialement bien avec du pus à staphylocoques. Le tissu n'est ni lésé ni modifié.

Melnik et Peosner¹⁹⁹ en 1937 citaient également des essais sur les maladies infectieuses, dans la pratique de l'hôpital.

La liste des cas cités est suffisamment large, semble-t-il, pour obtenir une vue suffisante des possibilités qui semblent être réservées aux applications pratiques du lysozyme.

Le moment paraît venu de procéder à des expériences en série qui seules permettront d'obtenir des résultats définitifs quant à son emploi dans l'usage courant de la clinique. Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus par ce groupe de savants russes sont encourageants et laissent entrevoir de *nouvelles possibilités thérapeutiques*.

Citons, pour terminer, des essais qui ont été faits par Tetz, pour déterminer son emploi éventuel dans l'industrie alimentaire. Il pensait pouvoir l'utiliser pour combattre la flore microbienne du lait, des extraits de viande et de divers aliments ; ces essais malheureusement n'ont pas été satisfaisants. Toute une série de facteurs, tels que l'influence des corps albumineux, l'adsorption par les graisses inhibent l'effet lytique du lysozyme.

CONCLUSIONS

Ainsi que le montre notre historique, la découverte du lysozyme est l'aboutissement des recherches qui ont été entreprises sur les leucocytes au début de ce siècle ; elle résulte indirectement des discussions passionnées qui suivirent les résultats obtenus en immunologie pour le sérum. Elle représente un argument sérieux en faveur de la théorie humorale.

Ainsi que l'ont montré les nombreuses recherches auxquelles il a donné lieu, le lysozyme a vu croître son importance au fur et à mesure de la découverte de ses diverses propriétés et qualités.

D'une action bactéricide purement locale dans le liquide buccal, le mucus nasal ou les larmes, on est amené à envisager *un mécanisme antibactérien général* répandu à peu près dans tout l'organisme. Il prend ainsi place dans la série des facteurs qui constituent les anneaux de la chaîne des substances antibactériennes auxquelles l'organisme doit son pouvoir physiologique de défense antiinfectieuse.

D'autre part, il vaut la peine de relever l'importance que pourra prendre l'emploi dans la thérapeutique de la substance pure. Jusqu'ici, tous les essais effectués l'ont été avec la substance purifiée ou concentrée par la méthode de Wolff ^{307, 36} ou de Bordet ; aucune observation clinique d'un traitement effectué avec la substance pure ou cristallisée n'a été publiée. Les résultats obtenus paraissent suffisants pour permettre d'augurer favorablement de l'avenir de cette substance.

En fait, il paraît peu probable que le corps humain ait été doté d'un pouvoir bactéricide aussi puissant sans but pratique. Cette large répartition, cette concentration particulièrement forte dans les tissus ou organes manquant d'autres moyens de protection (cartilage, œil, etc.) permettent de lui faire une place tout aussi honorable que celle des autres mécanismes similaires, dans la défense antibactérienne.

Au point de vue de la cavité buccale, on peut affirmer qu'il y joue *un rôle positif*, bien que le lysozyme du liquide buccal, comparativement à celui du blanc d'œuf ou des larmes, soit bien moins puissant (la plus haute dilution donnant une lyse complète en 1 heure à 45° est de 1/300 pour la salive, de 1/40.000 pour les larmes). D'autre part, il attaque, ainsi que nous l'avons vu, une catégorie de microbes définis, en majeure partie des saprophytes, semble-t-il ; par son action floculante et inhibante, bactéricide sans lyse, il y a cependant un rayon d'action beaucoup plus étendu sur de nombreux microbes pathogènes notamment.

En résumé, l'opinion de Metschnikoff, celle de Hugenschmidt, qui dominent jusqu'à l'heure actuelle le problème de l'action bactéricide du liquide buccal, doivent être profondément modifiées. *Le lysozyme est un facteur important de l'immunité naturelle* ; conjointement avec les inhibines et mutines dont il va être question au chapitre suivant, il confère au liquide buccal des propriétés antibactériennes certaines.

CHAPITRE IV

LE PHÉNOMÈNE DE DOLD : INHIBINES ET MUTINES

Au cours de recherches effectuées de 1932 à 1933, concernant la pathogénie et l'épidémiologie de la diphtérie, Dold et Weigmann ^{69, 70} s'étaient intéressés *au rôle des sécrétions dans les infections*.

Ils partaient de l'hypothèse suivante : *c'est au niveau des surfaces* que se passent les premiers phénomènes de l'infection, donc déjà sur la couche la plus externe, formée par le liquide de recouvrement sécrété par les cellules vivantes.

Ils furent ainsi amenés à étudier le rôle du liquide buccal et prirent connaissance des travaux de Fleming, notamment sur l'inhibition du *B. diphtérique*. Ils reprirent et reconsidérèrent ce problème sous l'angle particulier de leur hypothèse.

Ils effectuèrent leurs expériences sur des cobayes d'abord, puis sur des singes. Ils tentent en particulier d'inoculer la diphtérie en déposant des germes virulents sur la muqueuse de la gorge et du nez de ces animaux.

Le cobaye normal, dont on connaît le manque en antitoxines diphtériques dans le sang et les tissus, est également très sensible à la toxine diphtérique. Or, *il fut impossible d'obtenir une diphtérie*, malgré un dépôt massif sur la muqueuse du nez et de la gorge de bacilles fortement virulents.

De même chez 9 singes, fortement sensibles à l'inoculation parentérale de la toxine, on ne réussit pas à provoquer une diphtérie quoique, fait remarquable, 2 animaux sur 3 se révélèrent sensibles à l'infection par le streptocoque.

On constate ainsi une immunité élevée de la muqueuse de la gorge et du nez contre le bacille diphtérique virulent chez ces animaux, bien qu'ils soient sensibles à l'inoculation de ces mêmes microbes par voie parentérale. Or, et c'est là le deuxième fait remarquable,

Les bacilles virulents bien caractéristiques, inoculés, disparaissaient ; au bout de quelque temps, on remarqua l'apparition de bacilles pseudo-diphthériques.

Les expériences furent alors étendues à l'homme ; on examina la salive de 4 adultes et de 3 enfants sains. On constate également une action inhibitrice amenant la mort des bacilles étudiés et, d'autre part, une transmutation de bacilles diphthériques virulents en bacilles pseudo-diphthériques apathogènes. Ce résultat était obtenu avec du liquide buccal frais ; chauffé pendant 30 minutes à 56°, il se révéla inactif. Cela prouvait, sans vouloir d'ailleurs diminuer l'importance de l'antitoxine, que la qualité du liquide buccal est au moins aussi importante que la teneur du sang en antitoxines diphthériques.

Les auteurs remarquaient cependant que les effets varient suivant les individus et peuvent même faire complètement défaut.

Ces faits amenèrent Dold à définir les substances susceptibles d'inhiber les microorganismes ; il nomma *inhibines* toutes celles se trouvant dans ou sur le corps d'êtres supérieurs (homme, animal, plante), susceptibles d'inhiber la croissance des organismes inférieurs, spécialement les microorganismes sans les tuer ou les lyser.

Il désigna sous le nom de *mutines* toutes celles qui ont un effet de transmutation sur les microorganismes, transformant des bactéries pathogènes en bactéries apathogènes pour l'homme.

Ces substances furent alors systématiquement étudiées comme cela avait été le cas pour le lysozyme. Cependant, la découverte ne datant que de 1934, il est normal que celles-ci ne soient pas encore aussi avancées ; néanmoins on peut se faire une idée assez complète de la question, notamment de leur rapport avec le lysozyme dont elles semblent être parentes à première vue.

Notons, cependant, que quelques auteurs avaient prévu la chose ; ainsi Cadiot et Mandoul⁴³, en 1909 déjà, constataient que des bacilles diphthériques, prélevés dans la gorge de malades, se révèlent hautement pathogènes pour le cobaye. Sur la muqueuse nasale, par contre, ils paraissent apathogènes.

Il semble, écrivaient-ils alors, que la muqueuse nasale a une *influence affaiblissante et en même temps conservatrices* ; les bacilles diphthériques qu'on y trouve ressemblent fort aux bacilles pseudo-diphthériques morphologiquement, mais les auteurs n'ont pas pu découvrir de caractères différentiels constants.

Des constatations identiques se trouvent chez Bezi²⁹ en 1932.

PROVENANCE

Les expériences faites jusqu'ici ont montré qu'il existait des effets inhibiteurs puissants dans le corps humain et animal. Cependant, il faut nettement distinguer : *les sécrétions des surfaces*, destinées à entrer en contact avec l'extérieur, lesquelles *présentent des effets les plus forts*, et celles des cavités fermées du corps qui n'en présentent que des traces ou pas du tout (Feigs).

Il existe un groupe intermédiaire représenté par la muqueuse intestinale ; celle-ci présente également des réactions inhibitrices, mais celles-ci sont plus faibles que dans le groupe précédent. Toutes les parties en ont, mais la teneur de la muqueuse de l'intestin grêle est la plus constante ; on peut en faire la preuve jusqu'à 24 et 48 heures après.

Ce groupe serait actif contre certaines bactéries seulement, pour d'autres il pourrait même favoriser leur croissance (bile).

Le sperme se rattacherait à la deuxième catégorie avec cette différence qu'il favorise la croissance de toute une série de microorganismes.

Un tableau complété d'après les travaux les plus récents de Dold et de ses collaborateurs résumera l'état de la question ^{56, 67, 71}.

Inhibines chez l'homme :

Salive, mucus nasal, lait, sécrétions bronchiques, intestinales, bile et urine.

Inhibines chez l'animal :

Bile (cobaye, lapin, bœuf), lait, blanc d'œuf, miel (naturel seulement), système digestif.

Aucun effet inhibiteur :

Sécrétions des cavités closes : liquide synovial, humeur aqueuse (bœuf et lapin), sperme.

Inhibines chez les plantes :

Pomme de terre, rave jaune, concombre, oignon, raifort, pomme et banane.

LEUR ACTION

Elle est spécialement intéressante, car elle s'est révélée très intense dans le liquide buccal ; il en va de même pour le phénomène de transmutation des espèces.

Ainsi des bacilles diphtériques sont transformés en pseudo-diphtériques après avoir été soumis pendant plusieurs semaines à l'action du liquide buccal frais.

On a également pu constater des variations de coloration de certaines cultures et un comportement différent avec certaines méthodes de coloration. Il peut s'agir soit d'une modification réversible, soit d'une modification irréversible : ce sont *les mutines*.*

C'est Weigmann et Köhn qui en ont apporté la preuve définitive ^{294, 295}.

Au cours de différentes recherches, ils cherchèrent à déterminer s'il y a une action différente suivant les souches exposées à l'action du liquide buccal. Ils utilisaient des souches, différenciées en types *gravis*, *mitis* et *intermedius* par leur émission en acide dans le milieu suivant :

0,61 bouillon à la cystéine + 1 % de sucre de raisin + dextrine et amidon.

D'emblée, le phénomène de Dold est confirmé, tout en constatant des variations suivant les personnes. En utilisant des milieux identiques, il constate qu'un groupe de souches se transforme déjà après la première exposition à la salive. On voit apparaître quelques colonies noires avec bord gris légèrement vitreux (image correspondant à la description des bacilles pseudo-diphthériques de Hettehe) ¹²⁹.

La croissance de ces colonies est forte, elle présente une surface lisse, une pellicule jaunâtre sur le sérum de Loeffler ; elle ne scinde ni le sucre de raisin, ni la dextrine ou l'amidon, elle ne présente aucune action pathologique sur le cobaye. Leur forme est ronde, sur le sérum de Loeffler en fuseau. Ces caractéristiques sont en tous points identiques aux bacilles de Hoffmann.

Il faut remarquer que l'action du liquide buccal fut telle que toutes les souches examinées se transformèrent en une variante non pathogène, sans distinction de type. Toutes perdirent les quatre caractères distinctifs des bacilles diphthériques virulents :

- a) Forme de bâtonnets, allongés en massue.
- b) Formation de granulations polaires.
- c) Croissance anaérobie.
- d) Fermentation du sucre de raisin et pouvoir pathogène.

Les types *mitis* et *intermedius* se transforment directement. Le type *gravis* passe par un type intermédiaire d'abord, puis se transforme.

Il est de fait que les convalescents présentent à peu près constamment des bacilles pseudo-diphthériques (van Riemsdijk, Hettehe et d'autres) ^{253, 129}. On trouve souvent des formes dégénérées et pseudo-diphthériques, les unes à côté des autres dans les frottis de gorge et du nez

* Cf. FRADKOFF (J.) — *Les Mutines* — Thèse (Lausanne) 1947, sous-presse.

de convalescents et de porteurs de germes. (Kliewe, Baerthlein, Schmitz, Bernard et Paneth) ^{148, 22, 265, 27}. On peut donc affirmer que ces pseudo-formes sont de véritables bacilles de Hoffmann et que les expériences faites *in vitro* peuvent être corroborées avec les constatations *in vivo*.

Pesch et Damm ²²⁶ rapportent des expériences identiques avec le pneumocoque. Pour eux, les recherches *in vitro* sont difficiles à apprécier ; cependant, en comparant des expériences faites avec du liquide buccal frais, inactivé ou filtré, on peut se faire une idée relativement juste de la réalité.

Il existe des substances antipneumocociques dans le liquide buccal qui agissent en relativement fort peu de temps. Elles sont sensiblement plus actives à la température du corps qu'à la température ambiante. Des repiquages successifs augmentent fortement le pouvoir bactéricide. On n'a pu constater cependant une influence sur le type sérologique, même après une action prolongée. Les pneumocoques perdent totalement leur virulence pour les souris : on a donc bien sous l'influence du liquide buccal une transformation de bacilles virulents en bacilles non virulents.

On a également retrouvé des mutines dans l'urine ⁶³. Celles-ci sont capables d'agir sur le staphylocoque doré et de lui faire changer de couleur. Elles sont thermostables. Sur les géloses au lait frais, on obtient un résultat identique sur *B. prodigiosus*, le staphylocoque doré et le pyocyanique. On réussit à modifier considérablement leur pouvoir chromogène.

Quant aux inhibines, il faut bien remarquer que ces substances sont inhibantes, comme leur nom l'indique, et non pas lysantes. Elles agissent sur la croissance et le développement des micro-organismes sans les tuer directement ou les lyser. L'intensité de leur action augmente avec l'âge ; elle varie suivant les individus et les microbes à influencer (Dold et Weigmann) ^{63, 70}.

Dold a été l'objet de critiques très vives quant à ses méthodes d'expérimentation. Pour faire la preuve de ces principes, il utilise trois procédés ³⁰² :

1. La technique dite de la putréfaction ; les sécrétions à étudier, soit à l'état naturel, soit après avoir subi l'action de différents facteurs (chaleur, lumière, etc.), sont exposées à l'air libre et l'on examine le moment où la putréfaction s'installe.

2. Le procédé du mélange gélosé : les sécrétions à étudier, à l'état naturel ou après avoir été soumises à divers facteurs, sont mélangées

en proportions égales avec de la gélose ; on en fait des plaques et celles-ci sontensemencées d'après une méthode exactement prescrite. On détermine le degré de croissance par comparaison avec une gélose témoin.

3. Le procédé dit « Auftropfverfahren », qui consiste à laisser tomber le liquide à étudier, goutte à goutte, sur des plaques de géloseensemencées d'après un mode prescrit. On apprécie le degré de croissance autour des gouttes.

RAYON D'ACTION

Après avoir prouvé l'action des inhibines contre la flore autochtone du liquide buccal, les recherches ont porté, comme pour le lysozyme, sur tous les autres hôtes possibles de la cavité buccale (cocci, bacilles, vibrions, B. sporulés, capsulés, acido-résistants). C'est l'œuvre de Dold, Weigmann, Lächele, Du Dcheng Hsing et celle de Berg.

Un tableau d'après Wendling²⁰² résumera les principales données concernant le liquide buccal.

<i>Espèces bactériennes</i>	<i>Plaque gélosée salive fraîche</i>	<i>Témoin plaque gélosée, salive inactivée</i>
B. diphtériques	—	+++++
B. pseudo-diphtériques	±	+++++
Staphylocoques pyog. dorés	—	+++++
Tétragènes	—	+++
Streptocoques	—	++
B. coli	++	+++++
B. typhi	—	+++++
B. para B.	+	+++++
Prodigiosus	+	
Pyocyaniques	±	+++++
Vibrions Metschnikoff.	—	+++
Vibrions cholériques .	—	+++
Charbon	—	+++++
B. Friedlander I	—	+++++
B. Friedlander II	—	+++
Rhinosclérose II	—	+++
Rhinosclérose III	—	+++
Ozène I	—	+++
Ozène II	—	+++

Note explicative : — = pas de croissance visible macroscopiquement (après 24 heures).

± = trace de croissance visible macroscopiquement.

+ = faible croissance.

++ = moyenne croissance.

+++ = croissance forte.

++++ = croissance très forte.

Ce tableau montre que l'effet inhibiteur existe pour tous les germes étudiés. On constate cependant des différences pour le *B. coli* surtout, pour le para *B.* et le *B. prodigiosus*. L'effet inhibiteur se fait cependant nettement sentir comparé aux géloses témoins.

En ce qui concerne les *bacilles acido-résistants*, une communication de Dold et Ochsenreither⁶⁷ montre que le liquide buccal est également actif contre les BK. Corroborant les expériences de Martenstein^{183, 51, 52}, Amstein, Courmont, Gardere et Pichat, l'expérience montre que le sérum sanguin possède également ce pouvoir. Ces facteurs seraient thermostables contrairement à ce qui se passe avec le facteur inhibiteur des bactéries non acido-résistantes.

Cela prouve que l'on est en présence d'un autre mécanisme d'action, spécial au liquide buccal. Celui-ci s'est révélé plus fort dans le liquide buccal que dans le sérum.

Les autres sécrétions qui entrent en contact avec l'extérieur et présentant également des inhibines ont été étudiées systématiquement. Le mucus nasal se comporte comme la salive.

Dold⁶¹ a procédé d'une façon originale pour la muqueuse trachéale : il préleva dans des conditions identiques 2 fragments de muqueuse trachéale, l'un vivant et l'autre mort. En respectant pour chacun des deux prélèvements les conditions d'asepsie et de stérilité les plus rigoureuses, ilensemence les deux fragments avec du *B. prodigiosus*.

Après un séjour de 24 heures à l'étuve, la pièce dévitalisée présentait une forte croissance, tandis que l'autre était encore stérile. L'expérience fut renouvelée avec d'autres bactéries, notamment le charbon avec le même succès. On en peut conclure qu'il existe pendant deux à trois jours des inhibines sur le fragment prélevé vivant, puis il y a diminution progressive. *In vivo*, par contre, la production continue et maintient un taux relativement constant.

Dans le lait de femme et de vache⁷¹, on en a également retrouvé ; ils agissent contre les bactéries propres du lait et contre les bactéries

étrangères également ; entre autres celles qui sont attaquées par le liquide buccal : *B. bang*, *mesentericus* et *mycoïdes*.

Le lait a une action antibactérienne plus forte que la salive ; elle diminue cependant avec l'augmentation des microbes.

L'urine stérile présente aussi quelques différences⁶³ ; elle inhibe, à part les microorganismes mentionnés pour le liquide buccal, le *B. dysenteriae* (Shiga-Kruse et Flexner), *mesentericus*, *mycoïdes*, *septicemiae hemorrhagicae*, *pestis*, *Smegma*, *Timotheegrass bacillus*. Elle ne présente aucun effet sur le staphylocoque blanc ou doré, le *B. coli*, le tétragène et le *B. bang*. La substance se révéla thermostable à 100°.

Signalons encore que le miel naturel inhibe toutes les bactéries citées ci-dessus, sauf les levures et les moisissures⁶⁴.

D'après Du Dcheng Hsing, des inhibines exerçaient un effet spécialement prononcé sur les bactéries formant des spores (charbon et subtilis^{66, 74}.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Elles ne sont pas encore aussi bien connues que celles du lysozyme ; cependant, on peut affirmer que les inhibines agissent le mieux sous la forme diluée qui leur est propre dans les sécrétions. L'effet diminue promptement après dilution spécialement avec la solution physiologique.

Effet de la température. — Elles sont inactivées par un chauffage de trente minutes à 47-52°, à 56° trois à six minutes suffisent, à 75° deux minutes, et à 100° une minute détruit complètement leur action. On peut donc les considérer comme hautement thermolabiles (Lächele)¹⁶².

Action du froid : un abaissement de la température jusqu'à —5° n'a pas eu d'effet appréciable après dégel prudent et progressif (Dold, Lächele, Du Dcheng Hsing)⁶⁶.

Remarquons que la thermolabilité n'est pas aussi sûrement établie pour toutes les inhibines ; dans l'urine par exemple : un chauffage d'une heure à 60° est possible, le mécanisme inhibiteur opérant contre les bacilles acido-résistants est également thermostable (Ochsenreither et Dold)⁶⁷ ; enfin dans le blanc d'œuf qui en contient aussi, la thermostabilité est encore plus marquée (Wendling)³⁰².

Solubilité. — Elles ne sont pas solubles dans l'eau (Du Dcheng Hsing) ⁴⁴.

Précipitation. — Elles sont très sensibles envers l'alcool, le chloroforme et l'acétone, sans qu'il en résulte une précipitation cependant (Du Dcheng Hsing) ⁷⁴.

Adsorption. — Celles du liquide buccal n'ont pu être étudiées à ce point de vue, car elles sont liées aux particules corpusculaires de la salive. (Du Dcheng Hsing) ⁷⁴.

Filtration. — Les résultats sont contradictoires. Dold observe la suppression de l'effet inhibiteur après passage dans le filtre. Du Dcheng Hsing utilisa un filtre d'amianté (Seitz Filter) et obtiennent un résultat semblable.

Weigmann ^{293, 296}, cependant, estime que ces résultats dépendent de la *pression* utilisée ; Dold utilisait un filtre à basse pression, lui-même utilisant un filtre d'amianté à haute pression (2 atmosphères) et par l'action simultanée d'un gaz indifférent, l'azote, observe un pouvoir inhibiteur pleinement conservé. Il ajoute cependant que cet effet peut disparaître en utilisant la méthode de la plaque gélosée ; il ne semble exister en définitive que dans des échantillons très actifs et à l'état liquide. Ces résultats sont confirmés par Weigmann et Noeske ; Pesch et Damm, également avec le filtre d'amianté, obtiennent des résultats variables, un effet nettement diminué dans tous les cas.

Pour Dold, Lächele et Du Dcheng Hsing ⁶⁶, les conditions dans lesquelles les inhibines sont retenues dans le filtre ne sont pas connues ; Knorr ¹⁵⁴, au cours de nouvelles recherches, estime avoir éclairci la question : pour lui, c'est avant tout un problème de *technique*.

C'est ainsi qu'il rejette le filtre en terre de diatomées à cause de l'acide silicique qui produit certainement une adsorption et une action antimicrobienne non négligeable. Par contre, avec des appareils en verre fritté de Slott, on peut prouver la présence d'inhibines (ou noxin, comme il les appelle) dans les trois quarts du liquide buccal étudié.

La teneur varie considérablement suivant les époques pour un même individu. Il n'y aurait pas de différence entre le liquide buccal filtré et non filtré et entre échantillons actifs et inactifs. Seules les premières filtrations seraient actives, comme si les globules blancs écrasés contre la surface filtrante libéraient leurs produits, puis obstrueraient tout le filtre.

Diffusion. — Les inhibines ne diffusent pas. Du Dcheng Hsing ⁷⁴ en a apporté la preuve en utilisant la méthode de Fleming pour le lysozyme : il pratique une excavation dans une plaque de gélose, il y place du matériel contenant des inhibines, recouvre le tout de gélose fondue et ensemence toute la surface avec un germe sensible aux inhibines. Il obtient une croissance abondante : c'est la preuve qu'il n'y a pas de diffusion.

Les inhibines peuvent-elles être conservées ? Conservées pendant 8 à 10 jours à la température du laboratoire (15 à 20° C.) et à l'abri de la lumière, elles perdent tout leur effet antibactérien.

Dessiccation. — Les inhibines sont très sensibles à la dessiccation ; voici une expérience qui le démontre.

Quelques centimètres cubes de liquide buccal sont séchés à l'exsiccateur, puis redissous dans de l'eau distillée jusqu'à obtention d'un volume égal au volume primitif. On en fait une plaque gélosée, on l'ensemence avec des staphylocoques (inhibines-sensibles). 24 heures après, on constate une croissance normale sur toute la surface, la plaque témoin (avec de la salive fraîche) n'en présente aucune trace. (Dold, Lächele, Du Dcheng Hsing) ⁶⁶.

Effet de la lumière. — (Solaire.) D'après Du Dcheng Hsing ⁷⁴, l'effet inhibiteur est fortement diminué après une exposition de 1 heure aux rayons solaires, après 4 heures d'insolation, toute action antibactérienne a disparu.

EXTRACTION DE LA SUBSTANCE PURE

Elle n'a jamais été tentée jusqu'ici.

SA NATURE

Elle est également à peu près inconnue. Tout ce qu'on sait jusqu'ici c'est qu'elle n'a pas une structure complexe comme par exemple les anticorps du type ambocepteur (Wendling) ³⁰².

L'effet inhibiteur, qui peut être supprimé par chauffage, n'est pas rétabli par l'adjonction d'une petite quantité de salive fraîche (Lächele) ¹⁶².

Si, pour Dold, la nature de la substance ne paraît pas encore éclaircie, Weigmann pense qu'il s'agit *d'un corps albumineux* : la preuve en serait la réaction positive au biuret, obtenue après filtration à haute pression. D'ailleurs, on peut également mettre en évidence de la ptyaline dans ce filtrat.

Notons encore que Dold en 1941 ⁶⁰ procéda à un prélèvement stérile du suc de la glande sous-maxillaire chez deux chiens. Ce prélèvement était fait strictement aseptiquement ; il en fit la preuve et réussit à obtenir l'effet inhibiteur sur la croissance du *B. mycoïdes* charbon, diphtérique et divers germes aériens.

La preuve est ainsi faite que la salive primitive stérile contient des principes inhibiteurs ; on peut penser, d'après l'auteur, qu'il en est de même avec les glandes parotides et sub-linguales. Ces faits donnent ainsi une indication quant à l'origine de ces substances ; on pourrait l'envisager sous la forme d'une *sécrétion glandulaire*. L'effet inhibiteur fut prouvé à la fois contre les bactéries propres de la bouche et contre les hôtes étrangers.

Ajoutons, enfin, que Knorr ¹⁵⁴, à la suite de ses expériences de filtration, estime qu'il s'agit plutôt *d'une sécrétion due aux leucocytes*, à un produit vital libéré lors de leur destruction. Il l'identifie ainsi aux leucines et endolysines de Schneider et Petterson. Malgré cette hypothèse, il confirme la découverte de Dold quant à la substance elle-même et à ses propriétés. On voit ainsi que, si pour le lysozyme on a réussi à circonscrire le problème, à formuler une hypothèse plausible quant à sa constitution chimique et à sa nature, ici le problème reste entièrement à résoudre.

DISCUSSION DU PHÉNOMÈNE DE DOLD

Dès les premières publications de ces travaux, Dold et ses collaborateurs ont été l'objet de vertes critiques. On a incriminé d'une part *sa méthode d'expérimentation*, d'autre part *l'originalité de sa conception du pouvoir bactéricide du liquide buccal*. C'était le fait des tenants des autres théories concernant cette action : principalement, le lysozyme, l'antagonisme bactérien et l'action des sels.

Dold ⁶⁶, sans nier d'aucune manière les possibilités de ces mécanismes et tout en admettant qu'ils peuvent parfaitement exister à côté du sien et jouer un rôle certain, s'est efforcé de défendre sa

découverte. Ceci eut le mérite de bien préciser ses qualités et d'en dégager toute l'originalité.

Critiques quant aux méthodes d'expérimentation. — Dold et ses collaborateurs ont envisagé dès le début que le pouvoir bactéricide est une propriété ressortissant au liquide buccal dans son ensemble. Par conséquent, ils estiment essentiel de faire toutes les expériences avec du liquide buccal *total et non filtré*. Ils sont d'ailleurs pleinement conscients des inconvénients que cela comporte, mais ils estiment que les avantages l'emportent largement. D'autre part, si les auteurs qui les ont précédés ont eu des résultats différents, cela est dû principalement à des différences de technique.

Pesch et Damm²²⁶ estiment que si les recherches *in vitro* sont difficiles à juger, c'est qu'il y a toute une série de facteurs accessoires qui peuvent jouer un rôle, modifier ou contrecarrer les résultats : un taux élevé en aliments organiques peut masquer un pouvoir bactéricide élevé ; le pourcent en sel, les sulfocyanates, l'antagonisme bactérien, tous ces facteurs peuvent intervenir.

On peut les éliminer par filtration ou inactivation, mais alors on dénature complètement les liquides que l'on étudie. Ils estiment qu'en variant simplement les conditions, la température, par exemple, on arrive à se faire une idée suffisamment juste du phénomène.

Les difficultés sont donc très réelles ; Knorr soumet également à une analyse serrée ces méthodes ; ses considérations embrassent *le problème de l'expérimentation* dans le milieu buccal dans son ensemble. Il rend attentif au fait qu'on pourrait avoir une certaine élimination des microbes qu'on ensemence par une agglutination subie déjà dans la salive.

La numération des microbes est également très difficile. Citons quelques chiffres ; pour Hegemann¹²⁷, on aurait 20 à 30 millions de germes par centimètre cube, Berg²⁴, dans la plupart de ses prélèvements, aurait obtenu des chiffres bien en dessous de 1 million de germes par centimètre cube. Sur ce nombre, une grande partie des microbes étaient certainement morts ; or, ce n'est qu'à partir de 10 millions de germes par centimètre cube que l'on a un effet perceptible.

Si l'on peut parer à cette agglutination en ajoutant du violet de cristal au milieu, ce qui a pour effet d'éliminer les germes atteints et l'effet de l'antagonisme bactérien, il estime cependant préférable d'utiliser le liquide buccal *filtré*, car il obtient des résultats sensiblement identiques avec ou sans adjonction de violet de cristal.

Enfin, il conteste que celui-ci, par sa pauvreté en matière nutritives, empêche la croissance des microorganismes (suivant Dold, il ne resterait après filtration que des sels et de l'eau et, par conséquent, l'action inhibitrice n'aurait plus à s'exercer).

Or, si l'on compare les résultats des filtrats obtenus depuis Sanarelli ²⁵⁹, on constate que le plus souvent les auteurs rapportent que leurs filtrats sont dénués *en eux-mêmes* de toute propriété bactéricide ; il ne saurait donc être question d'un manque de nourriture.

Dold ⁶⁶ préconise un mélange du filtrat avec de la gélose et l'ensemencement de sa surface. Là, contre, il faut dire que la dilution du milieu jusqu'à 75 % avec un filtrat presque aqueux rend le milieu mauvais pour les bactéries délicates.

Comme les inhibines ne diffusent pas d'après Dold, il est possible que seul un liquide buccal très actif, et encore sera-ce l'exception, ne sera pas dépassé par les effets bactéricides du milieu (ce qui s'est passé dans les expériences de filtration de Weigmann et Noeske) ²⁹⁶.

On peut se demander si, après échauffement, ce ne sont pas ces effets qui tiennent la première place. Dans l'échauffement primitif de la salive, le principe inhibiteur peut être également conservé, mais dans un état colloïdal différent qui empêcherait son action.

En réalité, quelle que soit la méthode utilisée, il faut se rendre à l'évidence que ces expériences sont *très difficiles et très délicates* à conduire, surtout depuis qu'on a pu faire la preuve de la thermostabilité des inhibines. N'oublions pas que les conditions d'existence des microorganismes et de leur développement sont toutes différentes sur la gélose de ce qu'elles sont en réalité dans le milieu buccal.

Inhibines et lysozyme. — Du Dcheng Hsing, Lächele et Dold présentent dans leurs travaux de 1936 une première étude ^{74, 1, 2, 66}, de cette question. Martha Wendling ³⁰² en 1939 reprend ce sujet. Elle met en évidence les différences fondamentales de ces deux substances.

Un tableau présentera le résumé de ces données :

Lysozyme

Provenance : se trouve en concentration élevée dans les cavités fermées du corps (liquide péritonéal, synovie, plèvre). Ne se trouve que peu ou pas chez les plantes.

Mode d'action : action lysante principale, effets accessoires antibactériens non lysants.

Inhibines

N'existent pas dans les sécrétions des cavités fermées de l'organisme. Très répandues dans le règne végétal.

Action inhibante : unique.

Lysozyme

Champ d'action : principalement des germes saprophytes apathogènes, accessoirement quelques germes pathogènes (action inhibante ou floculante, bactéricide sans lyse).

Conditions particulières de cette action : il agit optimalement en concentration très diluée, il exige une concentration NaCl définie.

Inhibines

Exercent un effet inhibiteur sur tous les microbes étudiés jusqu'ici, y compris les acido-résistants. Il n'y a pas de très grandes variations d'effet; les bactéries pathogènes sont autant touchées que les saprophytes.

Action optimale sous la forme concentrée qui lui est propre dans l'organisme. Une dilution par NaCl par exemple, les inactive.

Qualités physiques et chimiques

Soluble dans l'eau.

Floculation : par l'alcool, le chloroforme et l'acétone.

Température : supporte 100° pendant 15 minutes sans dommage.

Adsorption : par filtre de papier, de porcelaine et de coton.

Filtration : il est filtrable, les premiers centimètres de filtrat sont exempts de lysozyme, ce n'est qu'après saturation du filtre que le lysozyme passe.

Diffusion : à travers la gélose.

Conservation : se conserve très facilement, 2 ans après, le titre reste relativement élevé.

Dessiccation : il la supporte très bien; on peut l'obtenir sous forme de poudre sans qu'il perde ses propriétés.

Influence de la lumière (lumière solaire) : le lysozyme est très résistant. Une exposition de 24 heures ne diminue pour ainsi dire pas ses qualités.

Insoluble dans l'eau.

Non floculables, quoique très sensibles à ces trois substances.

On doit distinguer plusieurs groupes de substances :

1. Mucus nasal, bronchique, liquide buccal et lait, thermolabilité marquée, destruction de l'effet par chauffage pendant 30 minutes à 56°.
2. Inhibines provenant des plantes et du blanc d'œuf : thermostabilité marquée.

Ne sont pas adsorbables (liquide buccal. Les autres sécrétions n'ont pas été étudiées jusqu'ici).

Les expériences sont contradictoires : les auteurs divergent considérablement.

Ne sont pas diffusables.

Ne se conserve pas. Après 8 à 10 jours, l'effet a complètement disparu.

Sont très sensibles à la dessiccation.

Très sensibles à la lumière. Une insolation de 24 heures sur des inhibines en couche mince supprime leur effet.

Tous deux ont une signification pour la défense de l'organisme; elle est cependant différente. Au point de vue des microbes attaqués,

si les inhibines s'attaquent aussi bien aux pathogènes comme aux non pathogènes, le lysozyme est surtout actif sur des saprophytes et sur une minorité de germes réellement pathogènes. Les inhibines ont donc une importance *plus grande* pour la défense antimicrobienne.

Au vu du tableau ci-dessus, on ne peut donc en aucune manière concevoir une identité quelconque entre ces deux substances. Dans presque toutes les propriétés, on retrouve des différences essentielles et fondamentales.

Inhibines et antagonisme bactérien. — Du Dcheng Hsing⁶⁶ s'est également occupé de cette objection : de nombreux travaux ont été faits en corrélation avec sa publication. Pour lui, l'action inhibitrice ne saurait reposer purement et simplement sur *l'antagonisme* bactérien. Les auteurs qui s'en sont occupés procédaient de la manière suivante :

Ils créent des plaques d'un mélange de gélose et de bactéries (par exemple : prodigiosus et pyocyanique ou Friedländer). Ilsensemencent là-dessus des bacilles diphtériques ou encore *B. typhi*, staphylocoques, etc. et obtiennent une inhibition.

Tout d'abord, les bactéries utilisées ne se rencontrent jamais en aussi grande quantité dans la bouche ; ensuite ces auteurs prétendent avoir vu 24 heures après déjà des colonies, en profondeur également. Ils semblent ainsi confondre des particules qui ne sont que des précipitations de mucines et d'éléments corpusculaires avec des colonies, d'autant plus qu'il n'y a pas de colonies visibles généralement avant 48 heures.

Si l'on tient compte de ces critiques et qu'on fait une plaque avec de la gélose à 50° et des bactéries extraites du milieu buccal, mises en culture séparément, on constate une faible croissance après un séjour de 24 heures à l'étuve. La plaque contrôle (gélose-salive) montrera l'effet inhibiteur habituel : aucune croissance.

Une autre expérience significative consiste à prélever 4 centimètres cubes de liquide buccal et à y ajouter après 24 heures 4 centimètres cubes de solution salée. Après avoir constaté la concentration en bactéries, on place le tout pendant 24 heures à l'exsiccateur. On en fait alors une plaque avec 8 cc. de gélose à 3 %. L'ensemencement se fait avec du *B. prodigiosus* ; on obtient une croissance magnifique.

L'effet inhibiteur s'est donc perdu. Or, cette suppression n'est pas liée à une destruction éventuelle des bactéries (leur vitalité est entière). Le mécanisme antagonisme ne joue donc qu'un rôle

secondaire. On peut faire également un essai avec du liquide buccal inactivé et rajouter des microbes, si l'on suppose qu'ils ont été tués par la température de 56°; l'effet n'est pas rétabli, ce qui confirme bien la conclusion première.

Le principal adversaire, Hegemann¹²⁷, est d'accord que l'effet inhibiteur est *un principe* thermolabile, non filtrable, dont l'action se perd après 48 heures, toutes qualités qui sont celles des inhibines. Il y ajoute la diffusion à travers la cellophane, ce qui n'y correspond plus; son principe résulterait de la présence des « cocci verts » ou antagonistes, comme il les définit; pour lui, plus des deux tiers de la flore buccale seraient représentés par ces bactéries.

Il est absolument catégorique sur ce point; on peut cependant lui rétorquer qu'il y a d'autres bactéries dans la flore buccale, qui diminuent d'autant le pouvoir antagoniste. Toute une série d'autres critiques sont également pertinentes, dit Dold; les conditions sont différentes en bouche de ce qu'elles sont sur un milieu artificiel; l'adjonction de nouvelles bactéries sur une plaque à mélange gélose-bactéries ne montre aucun effet inhibiteur, etc.

Nous citerons encore quelques travaux à ce sujet: ainsi Weigmann et Noeske²⁹⁶ estiment que le pouvoir antagoniste existe réellement et s'extériorise vis-à-vis de bactéries pathogènes et saprophytes. Il est possible de le supprimer par chauffage de 30 minutes à 56°, par filtration (amiante) ou en le laissant reposer quelques jours.

Ils estiment cependant que l'effet inhibiteur ne repose pas sur le pouvoir antagoniste: une plaque d'un mélange gélose-bactéries n'inhibe que bien faiblement la croissance des germes surajoutés, conclusion identique donc à celle de Dold.

Le liquide buccal très pauvre en bactéries a un effet identique à celui qui en contient beaucoup.

Hölzl¹³² également admet son existence; le streptocoque exerce un puissant effet antagoniste sur le bacille diphtérique. Il y aurait des substances secrétées qu'on doit rendre responsables de cette action: on peut les isoler par l'éther à partir du bouillon de culture.

On peut prouver leur action *in vivo*: l'injection à des cobayes de cette substance les protège contre le bacille diphtérique. Mais il faut bien se souvenir qu'il existe des conditions différentes dans le milieu buccal et sur les cultures. La plus légère pollution suffit à annihiler complètement cet effet inhibiteur; la flore propre est

suffisamment représentée pour créer cette pollution. L'antagonisme bactérien ne joue donc qu'un rôle réduit.

Des recherches ultérieures en collaboration avec Weigmann ont confirmé ce point de vue ²⁹⁶ ; Auerswald ¹² est également du même avis.

Nous terminons avec Knorr ¹⁵⁴. D'après lui, *l'effet du pouvoir antagoniste est indiscutable*, il est même assez gênant pour les expériences ; il faudrait donc pouvoir déterminer plus exactement son effet.

La plupart des auteurs jugent de la croissance d'une plaque sur le simple vu macroscopique. Or, il serait utile d'employer le microscope, car dans les milieux très dilués, nombre de microbes croissent commodément sans former de colonies (*cf.* association fuso-spirillaire) ; d'autre part, c'est une erreur de croire que les anaérobies ne croissent pas sur des plaques gélosées.

Le pouvoir antagoniste s'exerce soit par *antagonisme* pur ou par *épuisement* du milieu nutritif. Cet effet peut très bien être supprimé par la filtration, par étapes ; on obtient alors des résultats identiques avec des prélèvements actifs ou inactifs, ou en utilisant une dilution très poussée. On a ainsi l'explication des résultats contradictoires constants dans les débuts des expériences de filtration du liquide buccal. Il existe indiscutablement un effet d'ad et d'absorption au filtre qui est ainsi supprimé : cela prouve bien toute *l'originalité* du phénomène de Dold.

L'action des sels. — On a finalement prétendu que l'action des inhibines n'était autre que celle des sels. Ils existent effectivement dans le liquide buccal et particulièrement pour les sulfocyanates : nous avons vu que leur rôle est loin d'être négligeable.

Pour Clauberg ⁴⁷, entre autres, cette action des sels combinée à l'action osmotique est essentielle pour définir le pouvoir bactéricide du liquide buccal. Du Dcheng Hsing réfute également ce point ⁶⁶.

Il estime d'abord que la technique de Clauberg, « *Einsaatmethode* », est défectueuse. Elle consiste à mettre en contact avec du liquide buccal des bactéries, pendant un temps plus ou moins long, puis à en faire l'habituelle plaque gélose-salive et à observer la croissance des germes. Si l'on ensemence sur un filtrat de salive, ce dernier, se composant essentiellement d'eau et de sels, sera un milieu nutritif à priori très pauvre. D'autre part, le temps de contact nécessaire pour obtenir un effet bactéricide est variable suivant le microorganisme considéré. Dans les expériences de Clauberg, il a généralement été trop court.

Il y a de plus un défaut de méthode : par l'emploi du filtre (Seitz-filter¹), les inhibines sont retenues à son niveau. Pour faire une étude véritable de l'influence des sels, il faut les extraire, puis les mélanger avec de la gélose ou du bouillon, et l'on étudiera leur action sur les bactéries par la méthode habituelle des plaques.

On sèche 4 cc. de salive fraîche, le résidu est brûlé, puis les cendres sont dissoutes avec 4 cc. d'eau distillée et mélangée avec de la gélose. On en fait une plaque et l'on ensemence une bactérie inhibisensible, le staphylocoque par exemple. On se sert de la plaque habituelle gélose-salive comme contrôle. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a *aucune inhibition* : c'est donc la preuve que les sels également ne jouent qu'un rôle secondaire.

CONCLUSIONS

L'ensemble des données que nous possédons sur le phénomène de Dold nous montre *un mécanisme antibactérien nouveau d'une importance considérable* quant à l'action bactéricide du liquide buccal, distinct de tous ceux qui ont été décrits avant lui.

En effet, de par son rayon d'action, qui s'étend aussi bien aux microbes pathogènes qu'aux non pathogènes, il semble jouer dans l'organisme un rôle aussi conséquent que le lysozyme, disons de plus qu'il le complète, du fait de sa répartition et de sa concentration différente dans l'organisme.

Si nous l'envisageons à la lumière de la théorie de Dold ⁶¹ sur la défense antibactérienne du corps humain, son importance ne ressort que davantage. Pour lui, les premiers phénomènes qui se passent lorsque deux corps entrent en contact se déroulent toujours au niveau des surfaces. C'est un principe fondamental pour les corps organiques et inorganiques, petits ou grands, pour les macroorganismes comme pour les microorganismes. Il n'en va pas autrement pour les infections, c'est encore *au niveau des surfaces* qu'il faudra placer les premiers signes.

Or, si l'on considère les épithélies des muqueuses, la couche la plus externe est formée par un liquide de recouvrement sécrété par les cellules vivantes. Par conséquent, s'il existe un effet antibactérien déjà au niveau des sécrétions, celui-ci revêtira une grande importance pour la défense de l'organisme. Or, jusqu'ici, cette action fut fort

peu étudiée, son importance négligée : les inhibines amènent précisément la preuve de cette existence qui manquait jusqu'ici.

D'autre part, depuis dix ans, l'étude de la biologie des tissus des microbes montre que ceux-ci ont une tendance naturelle à conserver leurs qualités (virulence, par exemple). Actuellement, on peut affirmer qu'ils sont aussi capables de les changer. Rappelons les expériences de Pesch et Damm sur les pneumocoques, celles de Prica sur les bactéries capsulées. Par un changement du milieu, on peut obtenir un changement de pigmentation.

Ainsi *le phénomène inhibiteur* complété par celui *des mutines* révèle encore l'un des aspects du pouvoir antibactérien de l'organisme. Il permet d'envisager sous un tout autre angle l'épidémiologie de toutes les maladies infectieuses qui ont leur porte d'entrée dans les voies aériennes supérieures (diphtérie, scarlatine, rougeole, etc.). On pourra ainsi le considérer comme *le premier facteur* entrant en action contre une action microbienne.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous voici aux termes de cette étude : les divers éléments du problème sont posés. Si l'opinion officielle en est restée trop souvent aux conclusions de Hugenschmidt et à l'axiome formulé avec tant de netteté par Metschnikoff, niant toute action bactéricide du liquide buccal, admettant au plus une action bactériostatique, nous devons bien constater qu'une foule de faits nouveaux sont apparus depuis lors 1890 ; ils méritent certainement qu'on s'y arrête.

D'emblée, nous est apparue l'évidente nécessité d'envisager une définition nette et surtout large du milieu incriminé, de grouper sous une même définition tous les éléments entrant en jeu : nous disons : *le liquide buccal total*.

On a pu ainsi mieux montrer non seulement l'unicité propre du liquide buccal, mais encore la solidarité des facteurs qui ont été peu à peu mis en lumière et qui tous concourent au même but. Enfin, les échanges qui se produisent à partir du milieu buccal, soit directement par ses parois ou ses orifices naturels, démontrent les relations constantes qui existent avec le reste de l'organisme, *la coordination avec les processus généraux de défense*.

Loin d'avoir ainsi affaire avec une cavité extérieure au corps, on doit la considérer au contraire comme *un milieu vivant* tant pour la cavité et ses parois que pour son contenu : le liquide buccal. Milieu vivant, donc susceptible de défense contre l'extérieur, il agit dans le cadre de la défense générale de l'organisme. Défense à la fois passive, telle l'élimination mécanique des agents irritants par le liquide buccal ou active comme l'action des anticorps ou du lysozyme, par exemple ; là encore, l'exclusivisme n'a pas sa place. Bien au contraire, une série de mécanismes différents ont tous un rôle particulier à remplir dans un processus général antibactérien.

Dold a présenté en 1943 ^{61b} l'ensemble des modes antibactériens qui ont été étudiés. Il résume ainsi fort opportunément l'état actuel de la question.

Examinant l'ensemble de la défense antibactérienne du liquide buccal, on doit admettre les processus suivants :

1. Une action purement mécanique d'élimination des germes et agents irritants.
2. Phagocytose et anticorps.
3. Effet bactéricide :
 - a) Des substances provenant des leucocytes :
 1. Endolysines (Pettersen) ^{228, 229}.
 2. Leucines (Schneider) ²⁶⁷.
 - b) Les sulfocyanates.
 - c) L'anisotonie.
4. L'antagonisme bactérien (Valuda 1888, Dietrich 1890, Prica) ^{290, 55, 238, 91}.
5. L'activité antibactérienne des aliments et des boissons (alcool, épices, végétaux de la famille des poireaux : Kolle, Laubheimer, Vollmar) ¹⁵⁵.
6. Le lysozyme de Fleming.
Propriétés essentielles : c'est une enzyme, thermostable, filtrable, résistant à la dessiccation et à la lumière, action essentielle : lysante sur les saprophytes.
7. Les inhibines :
Propriétés essentielles : genre de ferments, à action inhibante non lysante, thermostables et non filtrables, actives seulement aussi longtemps qu'elles sont « vivantes ». Action identique sur les bactéries pathogènes et saprophytes.
8. Les mutines :

Transforment certaines qualités de bactéries.

Les mécanismes antibactériens énumérés sous les chiffres 1 à 5 sont connus depuis très longtemps. Cependant, leur action n'a été étudiée et bien élucidée que ces dernières années ; pendant longtemps ils étaient retombés dans l'oubli.

Depuis des mécanismes nouveaux ont été découverts ; avant tout, il convient de citer le *lysozyme*, dont l'action extrêmement violente et si nouvelle a permis de réviser d'emblée bien des jugements sommaires, trop souvent énoncés sans une connaissance suffisante du problème. Son étude, en effet, a eu, pour conséquence de créer une conception toute différente de l'action bactéricide des sécrétions. Si, au début, on a cherché à minimiser son importance, en arguant du fait que son effet s'exerce principalement sur des bactéries saprophytes, la suite des recherches a montré qu'il a également une action non négligeable sur les microorganismes pathogènes.

Les inhibines et mutines enfin, mises en lumière depuis 1934 et dont l'effet est spécialement étendu sur les bactéries pathogènes, tout en touchant aussi les B. saprophytes, achèvent de renverser toutes les préventions qui peuvent encore subsister contre l'efficacité du pouvoir bactéricide du liquide buccal.

Il est évident qu'il était difficile, jusqu'à ces dernières années, d'avoir, tout en admettant l'existence du pouvoir antibactérien, une conception bien nette de *l'ensemble* de ces mécanismes et de leur valeur réciproque. C'est le but de la science de faire l'analyse du phénomène complexe, de déterminer les processus partiels dont il est formé, et, si possible, de trouver la composition chimique de chacun des principes actifs. Ce travail est en cours, il n'est achevé que pour certains de ces agents antibactériens du liquide buccal. Force nous a donc été de les classer et de les nommer, soit d'après leur provenance (p. ex. leucine), soit d'après leur action (agglutinine, opsonine). Si l'on s'en réfère à cette dernière qualité, on constate que pour l'ensemble de ces processus, celle-ci se révèle sous trois modalités différentes :

D'après Dold ^{61b} :

- a) Principes qui inhibent (la croissance et la reproduction).
- b) Qui tuent (cidine).
- c) Qui provoquent une désagrégation destructive (lysozyme et lysine).

Ou encore d'après Knorr (1941) et cette classification nous paraît meilleure ¹⁵⁴ :

- a) Inhibines.
- b) Occidines.
- c) Mutines.

Si l'on admet de plus l'identité des leucines et des endolysines ^{125, 32} et celle de ces substances, soit avec le lysozyme (Barnes) ²⁰, soit avec les inhibines, d'après Knorr ¹⁵⁴, on voit que *le pouvoir bactéricide du liquide buccal peut se ramener à trois modes d'action antibactériens essentiels*, dont aussi bien le champ d'action que la technique défensive est différente, qui se complètent : trois mécanismes réels dont *l'action est irréfutable*.

Il est curieux de constater enfin que les recherches concernant la carie, qui occupent une si grande place dans la littérature dentaire, paraissent actuellement faire une place importante à l'influence des enzymes.

En effet les travaux récents de Eggers-Lura (*Rev. mens. suisse* dont n° 1, 39, 1946) ont mis brillamment en lumière le rôle d'un groupe

d'enzymes dans le processus de la carie. D'ores et déjà les théories chimico-parasitaire, chimique pure paraissent dépassées. Les travaux de Leimgruber (Berne) sont également significatifs à cet égard.

Cette importance nouvelle attribuée à certaines enzymes (phosphatase, oxydase, etc.⁰), tout en reconnaissant la valeur des ferments antibactériens prouve la volonté bien arrêté d'orienter l'art dentaire dans la voie médicale et de la faire bénéficier des progrès les plus récents de la chimie biologique et de l'enzymologie moderne. Elle souligne une fois de plus *le rôle essentiel si peu connu et si peu étudié des enzymes du liquide buccal.*

NOTE ADDITIONNELLE

D'après Eggers-Lura* (Copenhague), le groupe des enzymes du liquide buccal comprend les ferments suivants :

1. 2 lipases.
2. 2 phosphatases.
3. 1 amylase et 1 maltase.
4. 2 peptidases et 2 protéinases.
5. Plusieurs principes antibactériens (dont le lysozyme et les inhibines).
6. 1 enzyme coagulant le sang.
7. 1 oxydase (indophénoloxydase).
8. 1 peroxydase.
9. 1 catalase.
10. diverses déhydrogénases.
11. diverses autres enzymes dont la preuve n'a pas encore été faite d'une façon certaine par suite de l'absence d'une technique suffisamment poussée (sulfatase, rhodanase, mucinase).

A ce propos, il constate que :

1. Toutes sont constamment présentes dans le liquide buccal.
2. Leur provenance est diverse, il ne s'agit pas forcément d'une sécrétion des glandes salivaires, mais aussi à point de départ des tissus buccaux environnants, des micro-organismes, des vaisseaux sanguins ou d'autres sources d'enzymes à taux surélevé.
3. On peut admettre que leur présence n'a rien d'occasionnel mais est un phénomène normal et général.
4. Leur activité est variable :
Leur concentration n'a aucun rapport avec l'effet réel produit. Leur activité est maximum en présence du sentiment de faim et le matin ; de nombreux tests l'ont prouvé. Ceci concerne aussi bien les ferments respiratoires, digestifs et de combustion. Après la prise de nourriture, leur taux diminue sensiblement.
5. Leur puissance s'extériorise seulement après combinaison avec les coferments à poids moléculaire bas (souvent des vitamines). Elles ont des relations intimes également avec les hormones.
6. La courbe des enzymes du liquide buccal est le reflet fidèle des processus enzymatiques qui se déroulent dans d'autres parties du corps, elle est directement influencée par eux.

* *Rev. odont.* n° 1, p. 39 ss 1946 : « Enzyme und Karies. Die Enzyme des Speichels ». Verlag E. Munksgaard, Kopenhagen 1944.

Rev. odont. n° 10, p. 920 ss 1946 : « Untersuchungen über die Speichellipasen ».

Rev. odont. n° 7, p. 651 ss 1946 : « Untersuchungen über die Beziehungen zwischen dem Phosphor Gehalt des Blutes und des Speichels ».

Rev. odont. n° 3 p. 296 ss 1946 : « Phosphatase, Photphate und Karies ».

BIBLIOGRAPHIE

Abréviations utilisées :

- Act. paed. = Acta paediatrica.
 Act. pathol. microbiol. scand. = Acta pathologica et microbiologica scandinavica.
 Act. Soc. Med. Fenn. = Acta Societatis medicorum Fennicae Duodecim. Helsinki.
 Amer. Rev. Tbc. = American Review of tuberculosis.
 Ann. Inst. Pasteur = Annales de l'Institut Pasteur.
 Arch. Dermat. = Archiv für Dermatologie.
 Arch. Aug. hlkde = Archiv für Augenheilkunde.
 Arch. Hyg. = Archiv für Hygiene.
 Arch. Ophtal. = Archive of Ophtalmology.
 Arch. phys. norm. pathol. = Archives de physiologie normale et de pathologie.
 Arch. Phys. u. pathol. Chem. = Archiv für Physiologie u. pathologische Chemie u. Mikroskopie.
 Arch. Rom. pathol. microbiol. = Archives Roumaines de pathologie expérimentale et de microbiologie.
 Beitr. chem. Phys. Pathol. = Beiträge für chemische Physiologie u. Pathologie.
 Beitr. Klin. Tbc. = Beiträge zur Klinik der Tuberkulose.
 Berl. klin. Wschr. = Berliner klinische Wochenschrift.
 Biochem. J. = Biochemical Journal.
 B. J. exp. Pathol. = British Journal of experimental Pathology.
 Bull. Inst. Pasteur = Bulletin de l'Institut Pasteur.
 Bull. Hopkins Hosp. = John Hopkins Hospital Bulletin.
 Chos. med. Assoc. = Chosen medical Association.
 C. r. Soc. biol. = Comptes rendus de la Société de biologie de Paris.
 Cold SM. Harbour Symposia quant. biol.
 D. I. of. int. = Dental Items of interest.
 Dtsch. med. Wschr. = Deutsche medizinische Wochenschrift.
 Dtsch. Mnschr. Zahnhlkde = Deutsche Monatsschrift für Zahnheilkunde.
 Dtsch. Wschr. Zahnhlkde = Deutsche Wochenschrift für Zahnheilkunde.
 Frankf. Zschr. Pathol. = Frankfurter Zeitschrift für Pathologie.
 G. Batt. Immun. = Giornale di Batteriologia et Immunologia.
 G. Dermat. et Sifil. = Giornale di Dermatologia et Sifiligraphia.
 J. Phys. et pathol. gén. = Journal de physiologie et de pathologie générale.
 J. prakt. Chem. = Journal für praktische Chemie.
 J. amer. chem. Soc. = Journal of the american chemical Society.
 J. Bact. = Journal of Bacteriology.
 J. Bact. Pathol. = Journal of Bacteriology and Pathology.
 J. biol. Chem. = Journal of biological Chemistry.
 J. exp. Med. = Journal of experimental Medecine.
 J. gen. Phys. = Journal of general Physiology.
 J. Immun. = Journal of Immunology.
 J. inf. Dis. = Journal of infectious Diseases.
 J. Hyg. = Journal of Hygiene.
 J. med. Res. = Journal of medical Research.
 J. Pathol. = Journal of Pathology.
 J. of. A. D. A. = Journal of the american dental association.
 Kiel. med. Ges. = Kieler medizinische Gesellschaft.
 Klin. Wschr. = Klinische Wochenschrift.

Med. Klin. = Medizinische Klinik.

Med. Welt = Medizinische Welt.

Münch. med. Wschr. = Münchener medizinische Wochenschrift.

Mem. univ. California = Memoirs of the university of California (Berkeley).

N. Tand. Tid. = Norsk Tandlaege-for-enings Tidende.

Odont. Stomat. = Odonto Stomatologia (Moscou).

Prag. med. Wschr. = Prager medizinische Wochenschrift.

Proc. Roy. Soc. Series B = Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Science-Biology.

Proc. Roy. Soc. Med. = Proceedings of the Royal Society of Medicine (London).

Proc. exp. Biol. Med. = Proceedings of experimental Biology and Medicine.

Quart J. exp. Physiol. = Quarterly Journal of experimental Physiology.

Rev. Odont. = Revue mensuelle suisse d'Odontologie.

Wien. klin. Wschr. = Wiener klinische Wochenschrift.

Zschr. exp. Med. = Zeitschrift für experimentale Medizin.

Zschr. Hyg. = Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten.

Zschr. Immunf. = Zeitschrift für Immunitätsforschung.

Zschr. klin. Med. = Zeitschrift für klinische Medizin.

Zschr. Stomat. = Zeitschrift für Stomatologie.

Zbl. Bakt. I Orig. = Zentralblatt für Bakteriologie - Abteilung I Originale.

Zbl. Bakt. II Ref. = Zentralblatt für Bakteriologie - Abteilung II Referate.

A

N°		Tome	Page	Année
1.	ABELIN et STINER	Zschr. Immunf.	20	598 1914
2.	ABRAHAM E. P.	Biochem. J.	33	622 1939
3.	ABRAHAM E. P. et ROBINSON R.	Nature	140	24 1937
4.	ALLISON V. D. : <i>The effect of administration of vaccines on the lysozym content of tissues and secretions.</i>	B. J. exp. Pathol.	5	165 1924
5.	ALLISON V. D. : <i>The antigenic properties of lysozymdissolved vaccines.</i>	B. J. exp. Pathol.	6	99 1925
6.	ALLMENDINGER : <i>Dissertation Tübingen.</i>			1936
7.	ANDERSON, HAPPOLD, McLEOD and THOMSON.	J. Pathol. n° 34		1931
8.	ANDERSEN O.	Act. paed.	14	81 1932
9.	ANDERSEN O. : <i>Untersuchungen über das Lysozym.</i>	Zschr. Immunf.	70	90 1931
10.	APPLETON J. L. T. : <i>Über eine Schutzwirkung des menschlichen Speichels.</i>	Zschr. Stomat.	35	18 1937
11.	ARNOLD	J. Hyg.	29	82 1929
12.	AUERSWALD H. : <i>Welche Mikroorganismen wirken auf Diphtherie u. Pseudo-Diphtheriebazillen antagonistisch? Ein Beitrag zur Frage der Ursache der Hemmungswirkung des Speichels auf Diphtheriebazillen.</i>	Zbl. Bakt. I Orig.	142	32 1938
13.	AVERY O. T. and CULLEN G. E.	J. exp. Med.	38	199 1923
14.	AVERY O. T. and GOEBEL W. F.	J. exp. Med.	58	731 1933

B

15.	BAIL O.	Wien. klin. Wschr. n° 7		1911
16.	BAIL O.	Wien. klin. Wschr. n° 6		1923
17.	BAIL O.	Arch. Hyg.	32 36 52	
18.	BAIL u. PETTERSON	Zbl. Bakt. I Orig.	34 35 36	445
19.	BAIL u. SUZUKI	Arch. Hygn.	73	
20.	BARNES J. M. : <i>The enzymes of lymphocytes and polymorphonuclear Leucocytes.</i>	B. J. exp. Pathol.	26	264 1940

N°			Tome	Page	Année
21.	BARRON E. S. G. : <i>Oxydation of pyruvic acid.</i>	J. biol. Chem. ...	113	694	1936
22.	BARTHLEIN	Zbl. Bakt. I Orig. . Zbl. Bakt. II Ref.	81 57	430 89	1918 1913
23.	BELIKOFF P. F. et ASTRAHKANSKAJA Z. V.	Odont. Stomat. Moscou	7	26	1929 (B.heft)
24.	BERG : <i>Über die Ursache der Hemmungswirkung des Speichels auf das Wachstum der kapseltragenden Bakterien.</i>	Zschr. Hyg.	120	450	1938
25.	BERGE (Oslo) : <i>Rhodansalze im Speichel u. deren bakteriziden u. kolloido-chemischen Eigenschaften.</i>	N. Tand. Tid. ...	48	478	1938
26.	BERNARD	Zschr. Hyg.	79	179	1915
27.	BERNARD et PANETH	Zbl. Bakt. II Ref.	57	83	1913 (B.heft)
28.	BESTA KUHN	Zschr. Hyg.	116	520	1934
29.	BEZI I. : <i>A study of action of saliva and extract of tonsils upon diphtheria bacilli and diphtheria toxin.</i>	J. Immun.	28	17	1932
30.	BIONDI : <i>Die pathologischen Mikroorganismen des Speichels.</i>	Zschr. Hyg.	2	192	1898
31.	BLOOMFIELD A. L.	Bull. Hopkins Hosp.	33	61	1922
32.	BLUM K. : <i>Beiträge zur Kenntnis der Leukine.</i>	Arch. Hyg.	91	373	1922
33.	BOASSON E. H. : <i>On the bacteriolysis by Lysozym.</i>	J. Immun.	34	281	1938
34.	BOGENDORFER L.	Zschr. exp. Med. ..	41 52	637 274	
35.	BORDET J. : <i>Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses.</i>	Masson-Paris			1939
36.	BORDET M. : <i>Essais d'extraction du lysozyme.</i>	C. r. Soc. biol.	99	1252	1928
37.	BORTELS : <i>Über Beziehungen zwischen epidemiologischem und meterologischem Geschehen unter besonderer Berücksichtigung der Inhibinwirkung.</i>	Zbl. Bakt. II Ref.	143	74	1943
38.	BRINCK J. : <i>Die Bedeutung des Rhodans für die Autodesinfektion des Magens.</i>	Zschr. klin. Med. .	123	350	1923
39.	BRAILOWSKY-LOUNKEVITCH Z. A. : <i>Contribution à l'étude de la flore microbienne habituelle de la bouche normale.</i>	Ann. Inst. Pasteur	29	379	1915
40.	BRAUN	Zschr. Immunf. ..	44	27	1925
41.	BUCHNER	Arch. Hyg. Munch. med. Wschr. n° 30 ... n° 39/40/43 ... n° 47	10		1894 1899 1897

N°		Tome	Page	Année
42.	BUJANOWSKAJA I. S. : <i>Über die Herstellung des Lysozyms in gereinigtem und trockenem Zustand in: Arbeiten der wissenschaftlichen Konferenz in Kiew 1936, p. 471-474 (Ukraine).</i>	Cf. Zbl. Bakt. II Ref.	137 467	1939

C

43.	CADIOT et MANDOUL : <i>Rôle du mucus nasal dans l'épidémiologie de la diphtérie.</i>	J. phys. et pathol. gén. XI n° 2		1909
44.	CASAZZA R. : <i>Enzima bacteriolitico e suo comportamento nella cuti.</i>	G. Dermat. et Sifil.	279	1934
45.	CAVKA V. et PRICA M. : <i>Lysozym-wirkung in normalen u. pathologischen Augensekreten</i>	Graefe's Archiv. . .	121 740	1929
46.	CHAIN E. et DUTHIE E. S. : <i>Identity of Hyaluronidase and spreading factor.</i>	B. J. exp. Pathol.	21 324	1940
47.	CLAUBERG K. W. : <i>Le pouvoir bactéricide de la salive humaine pour le B. dyphtérique.</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	134 96	1935
48.	CONRADI	Beitr. chem. Phys. Pathol. 1		1902
49.	COPPONEX Alf. : <i>Le sulfocyanate de K. dans la salive.</i>	Thèse Genève n° 39		
50.	CORPER H. J. : <i>Lysozym and Tbc.</i>	Amer. Rev. Tbc. .	25 59	1939
51.	COURMONT et GARDÈRE	C. r. Soc. biol. . . .	95 96 101 105 109	1926 1927 1929 1930 1932

D

53.	DAHR et LINDAU : <i>Über die Ausscheidung von Blutgruppensubstanz bei einigen Säugetieren unter besonderer Berücksichtigung der Teilantigene der B-Substanz.</i>	Zschr. Immun. . .	91 470	1937
54.	DENYS et LECLEF : <i>La cellule</i> .	Paris		1895
55.	DIETRICH : <i>Die Bedeutung der Mikroorganismen der Mundhöhle für den menschlichen Organismus.</i>	Prag med. Wschr. n° 38	475	1890
56.	DOLD H.	Der Biologe	223	1934
57.	DOLD H.	Zbl. Bakt. I Orig. .	136 383	1936

N ^o			Tome	Page	Année
58.	DOLD H.: Bericht über die 17. Tagung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiol. in Berlin (1937). <i>Neue Beobachtungen über antibakterielle Hemmungsstoffe (Inhibine) u. antibakterielle Wandlungsstoffe (Mutine).</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	140	265	1937
59.	DOLD H.: Über antibakterielle Eigenschaften tierischer u. menschlicher Sekrete (Haut, Nase, Bronchial-Speichel).	Med. Klin.	1		1938
60.	DOLD H.: Die Bakterien-Inhibinwirkung (bakteriostatische Wirkung) sterilen sub-maxillaren Speichels des Hundes.	Zschr. Hyg.	124	519	1943
61.	DOLD H.: Die Inhibition (Keimvermehrungshemmung) als Abwehrmittel der normalen Tracheal-Schleimhaut gegen Infektion.	Zschr. Hyg.	124	528	1943
61b.	DOLD H.	Zschr. Hyg.	124	579	1943
62.	DOLD H. u. BARCZYK: Besitzt das menschliche Sperma antibakterielle Schutzstoffe?	Zschr. Hyg.	123	494	1942
63.	DOLD H. u. DECK F. W.: Über antibakterielle Hemmungsstoffe im sterilen Urin.	Zschr. Hyg.	123	383	1942
64.	DOLD H.-DU DCHENG HSING DZIAO: Nachweis antibakterieller licht- u. hitzeempfindlicher Hemmungsstoffe (Inhibine) im Naturhonig (Bienenhonig).	Zschr. Hyg.	120	155	1937
65.	DOLD H. u. FEIGS F.: Mangel an antibakteriellen Hemmungsstoffen in Sekreten geschlossener Körperhöhlen.	Zschr. Hyg.	122	692	1942
66.	DOLD H., LACHELE W., DU DCHENG HSING: Über antibakterielle Hemmungsstoffe des menschlichen Speichels.	Zschr. Hyg.	118	385	1936
67.	DOLD H. u. OCHSENREITHER: Untersuchungen über die Tbc. feindliche Wirkung des Speichels im Vergleich zu der des Blutserums.	Zschr. Hyg.	123	50	1940
68.	DOLD H. u. WEIGMANN	Kiel. med. Ges. ...		26. Jan.	1933
69.	DOLD u. WEIGMANN: Über die Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebazillen.	Zschr. Hyg.	116	158	1934
70.	DOLD u. WEIGMANN: Über Rachen- u. Nasenimmunität gegen Diphtheriebazillen bei Meerschweinchen u. Affen.	Zschr. Hyg.	116	146	1934

N°		Tome	Page	Année
71.	DOLD, WIZEMANN U. KLEINEN : <i>Über antibakterielle Hemmungs- stoffe (Inhibine) u. antibakte- rielle Wandlungsstoffe in der frischen, rohen, unter sterilen Kautelen entnommenen Milch (Kuh- u. Frauenmilch).</i>	Zschr. Hyg.	119	524 1937
72.	DUBOS R. (non publié), cf. MEYER, PALMER, THOMSON, KHORAZO.	J. biol. Chem. ...	113	479 1935
73.	DUBOS R. J.	J. exp. Med.	65	875 1937
74.	DU DCHENG HSING : <i>Dissertation Tübingen.</i>			1935
75.	DULISCOURT : <i>Recherches expéri- mentales sur une substance bactériolytique dérivée des germes autagonistes.</i>	Bull. Inst. Pasteur	340	1941
76.	V. DUNGERN U. HIRSCHFELD ...	Zschr. Immunf. ..	8	554 1910

E

77.	EDINGER U. CLEMENZ	Zschr. klin. Med. .	59	218 1906
78.	EDINGER U. TREUPEL : <i>Untersu- chungen über Rhodanverbin- dungen.</i>	Münch. med. Wschr. n° 39		1902
79.	EIGENBERGER E.	J. prakt. Chem. ..	130	75 1931
80.	EISKAMP E. H. and PARK L. K. .	J. inf. Dis.	28	67 1921
81.	ENDO : <i>Immunisatorische Unter- suchung der Streptokokkenarten im Mund.</i>	Zschr. Immunf. ..	84	410 1935
82.	EPSTEIN L. A. and E. CHAIN : <i>Some observations on the prepa- ration and properties of the sub- strate of Lysozym.</i>	J. exp. Med.	26	339 1940
83.	EVANS H.-MEYER K.- SIMPSON M.	Mem. univ. California	11	1933

F

84.	FEIGS F. : <i>Dissertation Freiburg i. Breisgau.</i>			1938
85.	FERRIER Edm. : <i>Recherches sur les germes de la bouche de l'homme et sur leurs localisa- tions.</i>	Thèse Lausanne...		1928
86.	FINDLAY G. M. : <i>A contribution to the aetiology of experimental Keratomalacie.</i>	B. J. exp. Pathol. .	6	16 1925

N°			Tome	Page	Année
87.	FLEMING Alexander : <i>On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions.</i>	Proc. Roy. Soc. Série B	93	306	1922
88.	FLEMING Alexander	B. J. exp. Pathol. .	3	252	1922
89.	FLEMING Alexander : <i>A comparison of antiseptics on bacteria and on leucocytes.</i>	Proc. Roy. Soc. Série B	96		1924
90.	FLEMING Alexander	B. J. exp. Pathol. .	8	214	1927
91.	FLEMING Alexander : <i>Arris and Gale Lecture on Lysozym, a bacteriolytic ferment found normally in Tissues and Secretions.</i>	The Lancet.....	1	217	1929
92.	FLEMING Alexander	Proc. Roy. Soc. Med.	26 21	71	1932 1928
93.	FLEMING Alexander and ALLISON V. D. : <i>Further observations on a bacteriolytic element found in Tissues and Secretions.</i>	Proc. Roy. Soc. Série B	94	142	1922
94.	FLEMING A. and ALLISON V. D. : <i>On the antibacterial power of Eggwhite.</i>	The lancet		1303	1924
95.	FLEMING A. and ALLISON V. D. : <i>On the Specificity of the protein of human Tears.</i>	B. J. exp. Pathol. .	6	87	1925
96.	FLEMING A. and ALLISON V. D. : <i>On the development of strains of bacteria resistant to lysozym action to intracellular digestion.</i>	B. J. exp. Pathol. .	8	214	1927
97.	FLOREY H. W. : <i>The relative amount of lysozym present in the tissues of some mamals.</i>	B. J. exp. Pathol. .	11	251	1930
98.	FREUDENBERG U. EICHEL	Liebig's Annals ...	510 518		1934 1935
99.	FRIEDBERGER	Zbl. Bakt. I Orig. .	30	336	
100.	FRIEDBERGER U. HODER : <i>Lysozym u. Flockungsphänomen des Hühnereiklars.</i>	Zschr. Immunf. ..	74	447	1932
101.	FRIEDENREICH U. WITH : <i>Über B-Antigen u. B-Antikörper bei Menschen u. Tieren.</i>	Zschr. Immunf. ..	78	152	1933
102.	FRIEDENREICH : <i>Über die Auffassung von den Ausscheidern u. Nichtausscheidern serologischer Gruppensubstanz.</i>	Zschr. Immunf. ..	91	39	1937
103.	FRIEDENREICH-THYSEN-HARTMANN.	J. Immun.	37	435	1939

G

N°		Tome	Page	Année
104.	GALIPPE	C. r. Soc. biol.		fév. 1894
105.	GENGOU	Ann. Inst. Pasteur.	35	1921
106.	GILDEMEISTER : <i>Untersuchungen über das Lysozym.</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	136 408	1936
107.	GILDEMEISTER U. NEUSTADT ...	Zbl. Bakt. I Orig. .	133 101	1934
108.	GODIN : <i>Versuche über Antikörperbildung gegen Muzin.</i>	Zschr. Immunf. . .	96 320	1936
109.	GOHAR : <i>On the Lysozym</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	119 240	1930
110.	GOLDSWORTHY-NEIL-FLOREY : <i>Some properties of mucus with special reference to its antibacterial properties.</i>	B. J. exp. Pathol. .	11 192	1930
111.	GOTSCHLICH E. : <i>Allgemeine Morphologie u. Biologie der pathogenen Mikroorganismen.</i>	In Kolle, Kraus, Uhlenhuth	¹ /1 33 ss.	1929
112.	GRABNER	Zschr. Stomat. ...	16 933 17 et 19	1934
113.	GRATIA A.	Ann. Inst. Pasteur	56 307	1936
114.	GREENBERG D. M.	J. biol. Chem. ...	82 545	1929
115.	GUNDEL U. HINSTEDT	Münch. med. Wschr.	72 1074	
116.	GUNDEL	Zschr. Hyg.	117 66	1936
117.	GUNDEL U. TIETZ	Zschr. Hyg.	116 439	1934

H

118.	HALLAUER C. : <i>Über das Lysozym</i>	Zschr. Bakt. I Orig.	114 519	1929
119.	HALLAUER C. : <i>Klinische u. experimentelle Untersuchungen über den Lysozymgehalt im Bindegewebe u. in der Tränenflüssigkeit.</i>	Arch. Aughklde ...	103 199	1930
120.	HALPERN	Zschr. Immunf. . .	11 609	1911
121.	HAMMERSCHLAG R.	Frankf. Zschr. Pathol.	18 152 18 160 23 272	
122.	HAMMERSCHLAG U. LAQUER	Frankf. Zschr. Pathol.	11 17 18	
123.	HARTMANN : <i>Sur le facteur antigroupe dans les glandes salivaires et la salive de l'homme.</i>	C. r. Soc. biol.	131 254	1939
124.	HARTMANN G. U. HARTMANN J. : <i>Destruction of group-antigens by enzymes.</i>	Act. pathol. micro-biol. scand.	18 365	1941

N°			Tome	Page	Année
125.	HAUSSMANN A.: <i>Über bakterizide Hemmungstoffe.</i>	Arch. Hyg.	95	78	1925
126.	HENDRIX J., L. WESTFALL, B.B.-RICHARDS A. N.	J. biol. Chem. ...	116	735	1936
127.	HEGEMANN: <i>Neue Versuche zur Klärung der keim-schädigenden Wirkung des menschlichen Speichels.</i>	Zschr. Hyg.	124	202	1943
128.	HENLE W.: <i>Zur Frage der Ausscheidung von Gruppen und speichelspezifischer Substanz.</i>	Zschr. Immunf. ..	80	171	1933
129.	HETTICHE O. H.	Klin. Wschr.	1	80	1935
		Zbl. Bakt. I Orig. .	134	421	1935
		Zschr. Hyg.	117	33	1936
130.	HODER: <i>Steht die bakterienlösende Wirkung des Lysozyms in einer Beziehung zur Wirkung des Immunkörpers ?</i>	Zschr. Immunf. ..	70	456	1931
131.	HOLIDAY E. R.	Biochem. J.	30	1795	1936
132.	HOLZL: <i>Antagonistische Wirkung der Mundstreptokokken auf Diphteriebazillen.</i>	Zschr. Hyg.	123	500	1941
133.	HUGENSCHMIDT H. C.: <i>Etude expérimentale de divers procédés de défense de la cavité buccale contre l'invasion des bactéries pathogènes.</i>	Ann. Inst. Pasteur	10	546	1896
134.	HUGENSCHMIDT H. C.: <i>Experimental study of the different modes of protection of the oral cavity against pathogene bacteria.</i>	Dental Cosmos....		oct.	1896

I

135.	IGNATIUS: <i>Über antibakterielle Hemmungstoffe im schleimigen Nasensekret.</i>	Zschr. Hyg.	118	444	1936
------	---	------------------	-----	-----	------

J

136.	JAKOB: <i>Dissertation Freiburg i. Breisgau.</i>				1937
137.	JELMOLJEVA Z. W. et BUJANOWSKAJA I. S.: <i>Lysozym, seine Eigenschaften u. Anwendungen, in Arbeiten der wissenschaftlichen Konferenz in Kiew 1936, p. 459-470 (Ukraine).</i>	cf. Zbl. Bakt. II Ref.	137	487	1939

N ^o			Tome	Page	Année
138.	JELMOJEVA Z. W. et BUJANOWSKAJA I. S. : <i>Über die Natur des Lysozyms.</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	122	267	1930
139.	JELMOLJEVA Z. W. et BUJANOWSKAJA J. S.	Acta Medica U. R. S. S.	1	248	1938
140.	JOOS : <i>Untersuchung über den Mechanismus der Agglutina- tion.</i>	Zschr. Hyg.	36	422	1901
141.	JURUSZYNSKA Janina : <i>Sur l'ac- tion bactéricide des larmes.</i>	Bull. Inst. Pasteur		441	1940

K

142.	KAUERZ : <i>Untersuchung über die Ausscheidung von B-Gruppen- substanz im Speichel.</i>	Zschr. Immunf. . .	92	460	1938
143.	KESTZJÜS u. MARTIN J.	Pflügers Archiv . .	239	408	1937
144.	KIGASAWA T. : <i>Antigene Eigen- schaften des Lysozyms.</i>	Zschr. Immunf. . .	57	146	1928
145.	KIGASAWA T. : <i>Lysozymswirkung des Eiklars.</i>	Zschr. Immunf. . .	54	154	1927
146.	KIMURA S. H. : <i>Untersuchungen über Lysozymswirkung im Tier- körper.</i>	Arch. Hyg.	96	272	1925
147.	KIN J.	Chos. med. Assoc. .	30	283	1940
148.	KLIEWE	Zbl. Bakt. I Orig. .	101	$\frac{6}{44}$ 199	1927
149.	KLEMPARSKAJA N. N. : J. J. Mikrobiol., Epimiol. u. Immun. (Russe), Folge 2/3, p. 124-1939.	cf. Zbl. Bakt. II Ref.	135	144	1939
150.	KLETZINSKY	Arch. Phys. u. Pathol. Chem.	V	172	1852
151.	KNOELL : <i>Ein Beitrag zur Prü- fung von Bakterienfilter.</i>	Zschr. Hyg.	121	298	1938
152.	KNORR cf. KOLLE-KRAUS-UHLENHUTH.		II	682	1929
153.	KNORR : <i>Mitt. d. Zentralverban- des f. Des. u. Hyg.</i>		II 6		
154.	KNORR : <i>Keimschädigende Stoffe (Bakterionoxine) im Mund- speichel.</i>	Arch. Hyg.	126	59	1941
155.	KOLLE-KRAUS-UHLENHUTH : <i>Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.</i>				
156.	KOLLE-LAUBREIMER u. VOLLMAR : <i>Wissenschaftliche Woche zu Frankfurt. Probleme der Bak- teriologie-Immunologie u. expe- rimentellen Therapie.</i>		III	9	1935

N°		Tome	Page	Année
157.	KORCHUN	Ann. Inst. Pasteur		1900
158.	KOSSJAKOW P. N.	Zschr. Immunf. ..	99	221 1941
159.	KRUGER	Dtsch. Wschr. Znhhlkde	I	517 1922
160.	KUSTER E. in KOLLE-KRAUS-UHLENHUTH.		VI/I	354 1930
161.	KUTTNER	Proc. exp. Biol. Med.	18	1921

L

162.	LACHELE : <i>Dissertation Tübingen.</i>				1935
163.	LANDSTEINER K.	J. exp. Med.	63	185	1936
164.	VON LAER, Walter : <i>Les microbes de la bouche.</i>	Thèse, Genève, n° 44			1926
165.	LANGMUIR I.	J. amer. chem. Soc.	38	2221	1916
166.	<i>The Lysozym</i> (anonyme)	The Lancet	II	455	1941
167.	LASCHENKO P. : <i>Über die keim- tötende und entwicklungshem- mende Wirkung des Hühnerei- klars.</i>	Zschr. Hyg.	64	418	1909
168.	LEDINGHAM J. C. G. : <i>Medical Research Council System of Bac- teriology.</i>	London H. M. Stationary Office	6	37	1929
169.	LEHRS : <i>Über gruppenspezifische Eigenschaften des menschlichen Speichels.</i>	Zschr. Hyg.	66	175	1930
170.	LEVADITI	Bull. Inst. Pasteur	12	481	1914
171.	LEVINTHAL W.	Zschr. Hyg.	110	182	1929
172.	LOCKEMANN G. u. ULLRICH W. : <i>Zur Kenntnis der keimschädi- genden Wirkung von Rhodani- den I.</i>	Zschr. Hyg.	111	417	1930
173.	LOCKEMANN G. u. ULLRICH W. : <i>Zur Kenntnis der keimschädi- genden Wirkung von Rhodani- den II.</i>	Zschr. Hyg.	117	777	1936
174.	LOCKEMANN G. u. ULLRICH W. : <i>Zur Kenntnis der Einwirkung saurer u. alkalischer Rhodan- lösungen auf Tbc.-Bazillen, 3. Mitt.</i>	Zschr. Hyg.	118	117	1936
175.	LOCKEMANN G. u. ULLRICH W. : <i>Zur Kenntnis der keimschädi- genden Wirkung von Rhodani- den IV.</i>	Zschr. Hyg.	114	584	1932
176.	LOCKEMANN G. u. ULLRICH W. : <i>Ein Vorschlag zur Schutzmass- nahme gegen Bakterienanste- kung durch den Mund.</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	136	284	1936
177.	LOCKEMANN G., HEINKEN : <i>Zur Kenntnis der keimschädigenden Wirkung von Rhodaniden IV.</i>	Zschr. Hyg.	120	1	1937
178.	LODE : <i>Experimentelle Untersu- chungen über Bakterien-Anta- gonismus.</i>	Zbl. Bakt. II Ref.	33	207	1903

M

N°		Tome	Page	Année
179.	MAC FADYAN..... Zbl. Bakt. I Orig. .	34	765	1903
180.	MAC LEOD J. exp. Med.	67	791	1938
181.	MANWARING W. H. : <i>The nature of bactericidal Substance in leucocytic extract.</i> J. exp. Med.	16	249	1912
182.	MARGRAITH B. G. The Lancet.....		545	1935
183.	MARTENSTEIN u. AMSTEIN : <i>14. Kongress der deutschen Dermat. Gesellschaft, Dresden.</i>			1925
184.	MATTHIES..... Beitr. Klin. Tbc. ...	73	94	1929
185.	MEISSNER..... Zschr. Hyg.	72		1912
186.	MELNIK : <i>Lysozym, Typhoid Fever, Diphteria and Rheumatism.</i> Charkoff, Metschnikoff Institute Monographs.			1936
187.	MELNIK et TCHERVIKOFF : <i>Etudes comparatives des propriétés immunisantes de divers antigènes dysentériques.</i> Bulletin de l'Institut Metschnikoff, T. II, p. 305, 1936.	cf. Bull. Inst. Pasteur	1080	1937
188.	MELNIK et TCHERVIKOFF : <i>Propriétés antigéniques de lysats de B. typhiques obtenus par le lysozyme.</i> Ibidem p. 311.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
189.	MELNIK et TCHERVIKOFF : <i>Propriétés antigéniques de lysats de B. dysentériques obtenus par le lysozyme.</i> Ibidem p. 101.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
190.	MELNIK et TCHERVIKOFF : <i>Nouvelle étude des caractères antigéniques de lysats de B. dysentériques obtenus par le lysozyme.</i> Bull. Inst. Metschnikoff, T. III, n° 2, p. 21, 1936.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
191.	MELNIK et TCHERVIKOFF : <i>Nouvelle observation sur l'activité immunisante des lysats de B. typhiques obtenus par le lysozyme.</i> Ibidem p. 350	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
192.	MELNIK : <i>Un phénomène observé pendant l'étude du lysozyme.</i> Bull. Inst. Metschnikoff, T. III, n° 1, p. 1, 1936.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
193.	MELNIK et M. S. CHARIFF : <i>Essais d'application du lysozyme dans quelques dermatoses.</i> Bull. Inst. Metschnikoff, T. IV, n° 2, p. 245.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937

N°		Tome	Page	Année
194.	MELNIK et JOURBINE : <i>Caractères généraux du lysozyme.</i> <i>Bull. Inst. Metschnikoff</i> , T. II, n° 1, p. 5, 1935.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
195.	MELNIK et JOURBINE : <i>Un phénomène observé pendant l'étude du lysozyme.</i> <i>Bull. Inst. Metschnikoff</i> , T. III, n° 2, p. 217, 1937.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
196.	MELNIK, JOURBINE et KOLESNIKOV : <i>Présence du lysozyme chez les nourrissons.</i> <i>Bull. Inst. Metschnikoff</i> , T. II, n° 1, p. 17, 1935.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
197.	MELNIK et D. M. NATANSON : <i>Le lysozyme dans la maladie des yeux.</i> <i>Bull. Inst. Metschnikoff</i> , T. II, n° 1, p. 47, 1935.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
198.	MELNIK, M. P. NETSCHAJEWSKI, A. M. STAROBINETZ : <i>L'action du lysozyme sur les microbes anasérobies.</i> <i>Bull. Inst. Metschnikoff</i> , T. II, n° 1, p. 31, 1935.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
199.	MELNIK et A. PEOSNER : <i>Le lysozyme dans la pratique de l'hôpital p. les maladies infectieuses.</i> <i>Bull. Inst. Metschnikoff</i> , T. II, n° 1, p. 55 - 1935.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
200.	MELNIK et A. S. ZEITLIN : <i>L'influence du lysozyme sur les plaies suppurées.</i> <i>Bull. Inst. Metschnikoff</i> , T. II, n° 2, p. 41, 1935.	Bull. Inst. Pasteur.	1080	1937
201.	MERKEL : <i>Inhibine im Darm eines Kaninchens.</i>	Zschr. Hyg.	122 425	1941
202.	MERKEL : <i>Dissertation Freiburg i. Breisgau.</i>			1938
203.	MESROBEANU L. et NAEPPPEL O. :	Arch. Rom. pathol. microbiol.	11 277	1938
204.	METSCHNIKOFF : <i>Traité de l'immunité et des maladies infectieuses.</i> — Paris.			
205.	MEYER K.	Gold S. M. Harbour Symposia quant. biol.	6 91	1938
206.	MEYER K., THOMPSON R., PALMER J. W., KHORAZO D. : <i>The purification and properties of the lysozym.</i>	J. biol. Chem. ...	113 303	1936
207.	MEYER, PALMER, THOMPSON, KHORAZO : <i>On the mechanism of lysozym action.</i>	J. biol. Chem. ...	113 479	1935

N°		Tome	Page	Année
208.	MEYER K., THOMPSON, PALMER J. W., KHORAZO D.	Science	79 61	1934
209.	MEYER K. et PALMER J. W. ...	J. biol. Chem. ...	107 629	1934
210.	MILLER : <i>Die Mikroorganismen der Mundhöhle, die örtlichen u. allgemeinen Erkrankungen, welche durch dieselben hervor- gerufen werden.</i> — Leipzig.			1890
211.	MILLER	Dtsch. Mnschr. Zhnkde	193	1902
212.	MILLER B. F. et van SLYKE D. D.	J. biol. Chem. ...	114 583	1936
213.	MILLS Alb. : <i>L'action de la salive et du suc gastrique sur les bac- téries.</i> (Bruxelles 1896.)			
214.	MORGAN ELSON L. A.	Biochem. J.	28 988	1934
215.	MORGAN W. T. J.	Biochem. J.	31 2003	1937
216.	MUHLEBACH V. : <i>Die Rolle der Speichelkeime im Dold-Weig- mann Hemmungsphänomen.</i>	Zchr. Hyg.	121 571	1939

N

217.	NAKAMURA ONARI : <i>Über Lyso- zymwirkungen.</i>	Zschr. Immunf. ..	38 425	1924
218.	NETTER : <i>Microbes pathogènes contenus dans la bouche de sujets sains, maladies qu'ils provo- quent, indications pour l'hygié- niste et le médecin.</i>	Revue d'hygiène et de police sanitaire XI	6 501	1889
219.	NEUFELD	Dtsch. med. Wschr.	1	1924
220.	NORTHROP J. H.	J. gen. Phys.	13 761	1930
221.	NORTHROP	J. gen. Phys.	16 323	1933

O

222.	OCHSENREITHER WERNER	Dissertation Freiburg i. Breisgau		1940
------	----------------------------	--------------------------------------	--	------

P

223.	PAPACOSTAS G. et. GATÉ J. : <i>Les associations microbiennes.</i>	Doin Ed., Paris ..		1928
224.	PENROSE et J. H. QUASTEL : <i>Cell activity and cell structure.</i>	Proc. Roy. Soc. Séries B	107 168	1930
225.	PEREGALLO : <i>Passage des anti- corps du sang dans la salive.</i>	G. Batt. Immun.	XVI 186	1936

N°			Tome	Page	Année
226.	PESCH et DAMM : <i>Über die bakterizide u. virulenzvermindernde Wirkung vom Speichel auf Pneumokokken.</i>	Zschr. Hyg.	118	1	1936
227.	PETTERSON	Zbl. Bakt. I Orig. .	31	71	
228.	PETTERSON : <i>Über die bakteriziden Leukozytenstoffe u. ihre Beziehungen zur Immunität.</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	39	613	1905
229.	PETTERSON	Zbl. Bakt. I Orig. .	46 40 42 45	405 Heft 4, 46-5 » 1 » 2 u. 3	1908
230.	PETTERSON	Zschr. klin. Med. .	63		
231.	PETTERSON : <i>Studien über die Endolysine.</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	60	286	1911
232.	PINCUSSEN	Biochem. J.	195	79	1928
233.	PIRIE A.	B. J. exp. Pathol. .	29	99	1939
234.	PIRIE A. : <i>The effect of Lysozym on the union between a phage and the susceptible B. megatherium.</i>	B. J. exp. Pathol. .	21	125	1940
235.	PITTARD J. : <i>Recherches sur la fréquence du B. fusiforme chez l'homme et les animaux.</i>	Thèse Lausanne...			1932
236.	PONOMAREWA O. J. : <i>Anwendung des Lysozyms in der chirurgischen Praxis. Bericht für Mikrobiol., Epidemiol. u. Parasitol. T. 17, Folge 3/4, p. 293, 1939 (Russ.)</i> .	Zbl. Bakt. II Ref. .	139	473	1939
237.	PRAUSNITZ C.	Zbl. Bakt. I Orig. .	106	300	1928
238.	PRICA Milan : <i>Über die Frage antibakterieller Speichelswirkung auf kapseltragende Bakterien.</i>	Zschr. Hyg.	119	304	1937
239.	PRICA Milan : <i>Antagonistische Wirkung von Staphylokokken gegen kapseltragende Bakterien.</i>	Zschr. Hyg.	121	81	1938
240.	PRICA Milan : <i>Über die bakterizide Wirkung des Naturhonigs.</i>	Zschr. Hyg.	120	437	1930
241.	PRICKETT Paul S., MILLER N. J., McDONALD F. G. : <i>Lysozym-studies of tissues from animals deficient in vit. A.</i>	J. Bact.	33	39	1937
242.	PUTKONEN Tanno.....	Act. Soc. Med. Fenn. Duodecim., série A XIV, fasc. 2 Act. pathol. micro- biol. scand., suppl.	V	64	1930

Q

243.	QUASTEL J. H.	Biochem. J.	20	166	1926
------	--------------------	------------------	----	-----	------

R

N°		Tome	Page	Année
244.	REID P. E., ANDERSON M. X., STUBBLEFIELD H., IVY A. C. : <i>Action of sodiumthyocyanate against dysentery toxin (Shiga). An experimental study on dogs and rabbits.</i>	J. inf. Dis.	55 112	1935
244b.	REIN : <i>Physiologie des Menschen</i>			1943
245.	VAN DER REIS	Münch.med.Wschr.	1 325	1921
246.	REPLOH H. : <i>Die Bedeutung des Bakterienantagonismus für die Klinik.</i>	Med. Welt.....	409	1935
247.	RETTGER L. F. et SPERRY J. D. : <i>Eggwhite bacteriolytic proper- ties.</i>	J. Med. Res.....	37 315	1912
248.	REX-KISS BELA : <i>Beitrag zur Un- tersuchung der Gruppensub- stanz A im menschlichen Spei- chel.</i>	Zschr. Immunf. ..	101 405	1942
249.	REX-KISS BELA : <i>Untersuchun- gen über die serologischen Eigen- schaften der gruppenspezifischen Substanz A im Speichel u. Blut- serum des Menschen.</i>	Zschr. Immunf. ..	102 1	1943
250.	REX-KISS Bela : <i>Beiträge zu den serologischen Eigenschaften des Speichels.</i>	Zschr. Immunf. ..	102 112	1943
251.	RIDLEY F. : <i>Lysozym, an anti- bacterial body, present in great concentration in tears and its relation to infection of the human eye.</i>	Arch. Ophtal.....	57 647	1928
252.	RIDLEY F.	Proc. Roy. Soc. Med.		1928
253.	VAN RIEMSDYK	Zbl. Bakt. I Orig. .	75 202	1915
254.	ROBERTS E. A., HOUGHTON : <i>The preparation and properties of purified eggwhite lysozym.</i>	Quart. J. exp. Physiol.	27 89	1937
255.	ROBERTS E. A. H., MARGRAITH B. G., FLOREY H. W. : <i>A com- parison of Lysozym prepara- tions from eggwhite, cat and human saliva.</i>	Quart. J. exp. Physiol.	27 381	1938
256.	ROMEY A. et FRICKER J. : <i>Absence de pouvoir antagoniste micro- bien dans la salive.</i>	C. r. Soc. biol.	120 887	1935
257.	ROSEMAN : <i>Handbuch der nor- malen u. pathologischen Phy- siologie.</i>			1937
258.	ROSENOW. et AMOSS	J. Med. Res.....	25 81	1913

S

N°			Tome	Page	Année
259.	SANARELLI G. : <i>Der menschliche Speichel u. die pathogenen Mikroorganismen der Mundhöhle.</i>	Zbl. Bakt. I Orig. .	X	819	1891
260.	SASAKI H.	Zschr. Immunf. . .	77	102	1932
261.	SCHAFER W. : <i>Über die Bakterizidie menschlichen Speichels u. insbesondere über seinen Einfluss auf die Natur der Diphteriebazillen.</i>	Zbl. Bakt. I Orig. . Zbl. Bakt. I Orig. .	135 137	458 317	1934 1936
262.	SCHATTENFROH	Arch. Hyg.	31 35	27 184	
263.	SCHNEIDEGGER : <i>Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Lysozym auf Menschen u. Tierpathogene Virus-Arten.</i>	Archiv der Gesellschaft für Virusforschung	1	354	1940
264.	SCHIFF F. : <i>Über die Gruppenspezifische Substanz des menschlichen Körpers.</i>				1931
265.	SCHIFF u. SASAKI	Zschr. Immunf. . . Klin. Wschr. . n°	77 34	129 1426	1937 1932
266.	SCHMIZ K. E. F.	Zbl. Bakt. I Orig. . Berl. klin. Wschr. .	77 1 104	369 597 1925	1916 1917 1925
267.	SCHNEIDER	Arch. Hyg.	70	40	1909
268.	SCHNEIDER : <i>Kritisches u. Experimentelles über die Bildung der Leukine.</i>	Arch. Hyg.	75	167	1912
269.	SCHNEIDER : <i>Die bakteriiziden Funktionen der Leukocyten. Zeitschrift für Balneologie, Kliniologie u. Kurorthygiene.</i>	Jg.	6	645	1914
270.	SCHUBERT O. : <i>Diphtherie-Antitoxine im menschlichen Speichel.</i>	Prag. Selbstverlag.			1937
271.	SCHUBERT	Zschr. Immunf. . .	58	106	1928
272.	SCHULZ F. N. : <i>Handbuch der Biochemie des Menschen u. der Tiere.</i>				1925
273.	SCHWACHMAN H., HELLERMAN L. u. COHEN B.	J. biol. Chem. ...	107	257	1934
274.	SEITZ : <i>Beiträge zur Frage der anaphylaxogenen Rolle des Speichels.</i>	Zschr. Immunf. . .	18	126	1913
275.	SILBERSCHMIDT : <i>Zur Bakteriologie der Mundhöhle.</i>	Rev. Odont. 47, n°	10	1039	1937
276.	SIRAI	Tokjo Iji Sinsi, n° 2	409	1	1926
277.	SPENGLER Felix : <i>Die keimtötende Wirkung des Speichelrhodanids in Salzsäure.</i>	Zschr. Immunf. . .	85	307	1935

N°		Tome	Page	Année
278.	STREBINGER Dissertation Frankfurt			1921
279.	SUMNER J. B.: <i>Ergebnisse der Enzymforschung.</i>	6	201	1937
280.	SURANYI: <i>Über das Lysozym ...</i>	Zschr. Immunf. ..	49	166 1937
281.	SUZUKI Arch. Hyg.	74	343	1911

T

282.	TARABUCHIN A.: <i>Rhodankalium, ein neues Mittel zur Behandlung des Hautkrebses.</i>	Arch. Dermat. ...	168	519 1933
283.	TETZ W. J.: <i>Das Lysozym u. seine Anwendung in der Nahrungs- mittelindustrie, in Probleme der Ernährung, 743, 80, 1939 (Russe).</i>	Zbl. Bakt. II Ref.	139	473 1939
284.	TIETZ	Dtsch. med. Wschr.	I	834 1935
285.	TOSIRA: <i>Über die gruppenspezi- fische Substanz im menschlichen Speichel (Gr. A-B-AB).</i>	Zschr. Immunf. ..	93	110 1938
286.	TRIOLO G.: <i>Azione della saliva sui Batteri.</i>	Zbl. Bakt. II Ref.	24	596 1898
287.	TRONSDORFF	Arch. Hyg.	40	
288.	TSING YUNG TSU.....	Zschr. Immunf. ..	70	1937
289.	TURRO	C. r. Soc. biol.	84	1921

U-V

290.	VALUDA: <i>Compte rendu du Con- grès de tuberculose, Paris.</i>		258	1888
291.	VIGNAL: <i>Recherches sur les micro- organismes de la bouche.</i>	Arch. phys. norm. pathol.	6	1886

W

292.	WARBURG O.	Biochem. Ztschr. .	119	134 1921
293.	WEIGMANN u. HOLZL: <i>Untersu- chungen über die antagonistische Wirkung von Streptokokken ge- gen Diphtheriebazillen u. andere Bazillen.</i>	Zschr. Hyg.	122	673 1940
294.	WEIGMANN u. KOEHN: <i>Weitere Untersuchungen über die Wir- kung des menschlichen Spei- chels auf Diphtheriebazillen.</i>	Zschr. Hyg.	118	507 1936

N°			Tome	Page	Année
295.	WEIGMANN u. KOEHN : <i>Weitere Untersuchungen über die Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebazillen.</i>	Zschr. Hyg.	118	516	1936
296.	WEIGMANN u. NOESKE : <i>Untersuchungen über den antibakteriell wirksamen Faktor im menschlichen Speichel.</i>	Zschr. Hyg.	119	412	1937
297.	WEIL E. : <i>Über den Einfluss der Leukozyten auf die Aktivität des Blutsersums.</i>	Arch. Hyg.	70 71	173 233	1909 1909
298.	WEIL E. : <i>Untersuchungen über die keimtötende Kraft der weissen Blutkörperchen.</i>	Arch. Hyg.	74	289	1911
299.	WEIL E.	Arch. Hyg.	76	289	1911
300.	WEIL E. : <i>Über die Wirkungsweise der Kaninchenleukozyten.</i>	Arch. Hyg.	78	163	1913
301.	WEIL E.	Zbl. Bakt. Ref. ..	44	30	
302.	WENDLING Martha : <i>Über die Unterschiede zwischen dem Lysozym (Fleming) und den Inhibinen (Dold).</i>	These Freiburg i. Breisgau			1939
302b.	WEHRSE E.	Diss. Cologne			
303.	WHITE P. B.	J. Bact. Pathol ...	43	591	1936
304.	WHITE P. B.	J. Bact. Pathol. ..	44	276	1937
305.	WITEBSKY u. HENLE : <i>Die serologische Sonderstellung des Speichels.</i>	Zschr. Immunf. ..	80	108	1933
306.	WOLFF L. K. : <i>Untersuchungen über das Lysozym I.</i>	Zschr. Immunf. ..	50	88	1927
307.	WOLFF L. K. : <i>Untersuchungen über das Lysozym II.</i>	Zschr. Immunf. ..	54	188	1927/ 1928
308.	WOLLMANN E. et WOLLMANN L.	Ann. Inst. Pasteur	56	137	1936

X-Y

309.	YAMAKAMI K.	J. Immun.	12	185	1926
------	------------------	----------------	----	-----	------

Z

310.	ZEYLAND J. et PIASECKA-ZEYLAND E. : <i>Thiocyanate als der im menschlichen Speichel BK bakterizidwirkende Faktor.</i>	Beitr. Klin. Tbc. Tubercle Tubercle	91	249	1938 1924 1937
------	---	---	----	-----	----------------------

Quelques travaux américains parus pendant la guerre de 1939-1946 :

		Tome	Page	Année
BELDING P. H. and L. J. :				
<i>Diet, Bacteria and Disease.</i>	D. I. of int.	62	303	1940
<i>Alterations in morphology and reaction capacity of streptococcus salivarius.</i>	D. I. of int.	62	423	1940
<i>New light on dental caries or the influence of the modern diet on bacteria evolution.</i>	J. of A. D. A. ...	28	1645	1941
<i>Bibliographie étendue dans :</i>	D. I. of int.		911	1943
<i>Is caries transmissible ?</i>	J. of A. D. A.	30	713	1943
<i>Mutation of bacteria under dietous influence.</i>	J. of dental research	5	23	1944
THOMPSON et MAKODA Shibeya :				
<i>The inhibitory action of saliva on the dipht. bacillus : the inhibitory effect of the salivary streptococci.</i>	J. of bacteriology .		juin	1946
BELDING P. H. :				
<i>The inhibitory effect of the whole saliva.</i>	D. I. of int.	68	1200	1946

TABLE DES MATIÈRES

<i>Préface</i>	Page 11
<i>Introduction</i>	13

CHAPITRE PREMIER

LE LIQUIDE BUCCAL

1. Introduction	15
2. La salive	16
<i>a)</i> Provenance	16
<i>b)</i> Mécanisme de sécrétion	16
<i>c)</i> Mécanisme de régulation	16
3. Qualités physiologiques	17
4. Sa composition	18
<i>a)</i> Composants inorganiques	19
<i>b)</i> Composants organiques	19
5. Propriétés sérologiques	19
<i>a)</i> Expériences de sensibilisation	20
<i>b)</i> Les facteurs spécifiques de groupes	20
<i>c)</i> Les anticorps	24
6. La flore buccale	25
<i>a)</i> Généralités	25
<i>b)</i> Apparition et développement de cette flore	26
<i>c)</i> La flore autochtone de l'adulte	27

CHAPITRE II

LE PROBLÈME DE L'ACTION BACTÉRICIDE DU LIQUIDE BUCCAL

1. Introduction	31
2. Première partie: Recherches jusqu'en 1900, Kletzinsky (1852) - Sanarelli (1891) - Hugenschmidt (1896) - Triolo - Metschnikoff ..	32

	Page
3. Deuxième partie : Recherches depuis 1900	35
a) L'étude des leucocytes	35
b) L'action des sulfocyanates	39
c) L'antagonisme bactérien	42

CHAPITRE III

LE PHÉNOMÈNE DE FLEMING : LE LYSOZYME

1. Introduction	47
2. Provenance	48
3. Rayon d'action	51
a) Microbes touchés	51
b) Cultures de souches lysozyme-résistantes	55
4. Mécanisme de la lyse	58
a) Inhibitrice	58
b) Bactéricide sans lyse	58
c) Lysante	58
d) Floculante	58
5. Facteurs particuliers régissant son action	58
a) Dilution optimale	58
b) PH et phénomène de Nakamura	62
c) Augmentation de sa puissance lytique par la répétition des lyses	65
d) Influence de la chaleur	65
e) Facteurs divers	66
6. Propriétés physiques et chimiques	66
a) Solubilité	66
b) Précipitation	67
c) Action de la température	67
d) Adsorption	67
e) Filtration	68
f) Diffusion	69
g) Conservation	69
h) Dessiccation	69
i) Effet de la lumière	69
j) Sa destruction	70
k) Action des désinfectants, des substances oligodynamiques et des ferments	70
7. Propriétés antigéniques	71

	Page
8. Extraction de la substance pure	74
<i>a)</i> Méthode de Wolff	74
<i>b)</i> Méthode de Bordet	76
<i>c)</i> Méthode de Bujanowskaja	77
<i>d)</i> Méthode de Meyer, Thompson, Falmer, Khorazo	77
<i>e)</i> Méthode de Roberts	80
<i>f)</i> Cristallisation (Abraham et Robinson)	82
9. Propriétés de la substance pure	82
10. Sa nature	85
Le Ferment - Son action : une hydrolyse - Le substrat et les produits de lyse	91
11. Rapports avec le bactériophage	93
12. Applications pratiques	95
<i>a)</i> En pathologie oculaire	95
<i>b)</i> En pathologie infantile	97
<i>c)</i> Les vaccins	98
<i>d)</i> En pratique chirurgicale	98
13. Conclusions	99

CHAPITRE IV

INHIBINES ET MUTINES : PHÉNOMÈNE DE DOLD

1. Introduction	101
2. Provenance	103
3. Leur action	103
<i>a)</i> Mutines	104
<i>b)</i> Inhibines	105
<i>c)</i> Technique d'expérimentation	105
4. Rayon d'action	106
5. Propriétés physiques et chimiques	108
<i>a)</i> Effet de la température	108
<i>b)</i> Solubilité	109
<i>c)</i> Précipitation	109
<i>d)</i> Adsorption	109
<i>e)</i> Filtration	109
<i>f)</i> Diffusion	110
<i>g)</i> Dessiccation	110
<i>h)</i> Effet de la lumière	110

	Page
6. Extraction de la substance pure	110
7. Sa nature	110
8. Discussion du phénomène de Dold	111
a) Méthodes d'expérimentation	112
b) Inhibines et lysozyme	113
c) Inhibines et antagonisme bactérien	115
d) Inhibines et action des sels	117
9. Conclusions	118
<i>Conclusions générales</i>	120
<i>Note additionnelle</i>	124
<i>Bibliographie</i>	127

ACHEVÉ D'IMPRIMER
SUR LES PRESSES DE L'IMPRIMERIE CENTRALE DE LAUSANNE
EN JANVIER MIL NEUF CENT QUARANTE-HUIT

